

532,948

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 5 月 13 日 (13.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/039989 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/85, 5/10  
(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014028  
(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 31 日 (31.10.2003)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(30) 優先権データ:  
特願 2002-318846  
2002 年 10 月 31 日 (31.10.2002) JP

美香子 (SHIROUZU, Mikako) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号独立行政法人理化学研究所横浜研究所内 Kanagawa (JP).  
坂本 恵香 (SAKAMOTO, Ayako) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号独立行政法人理化学研究所横浜研究所内 Kanagawa (JP).  
坂本 健作 (SAKAMOTO, Kensaku) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号独立行政法人理化学研究所横浜研究所内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 志賀 正武, 外 (SHIGA, Masatake et al.); 〒104-8453 東京都中央区八重洲2丁目3番1号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒351-0198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP). 独立行政法人科学技術振興機構 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(81) 指定国 (国内): CA, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 横山 茂之 (YOKOYAMA, Shigeyuki) [JP/JP]; 〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町一丁目7番22号独立行政法人理化学研究所横浜研究所内 Kanagawa (JP). 白水

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF EXPRESSING PROTEIN HAVING UNNATURAL AMINO ACID INTEGRATED THEREINTO

(54) 発明の名称: 非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法

(57) Abstract: A method of expressing a protein having an unnatural amino acid integrated thereinto characterized by comprising expressing (A) a mutant tyrosyl tRNA synthase which is a mutant of *Escherichia coli*-origin tyrosyl tRNA synthase and has an elevated specificity for a unnatural tyrosine derivative compared with the specificity for tyrosine, (B) a suppressor tRNA originating in an eubacterium belonging to the genus *Bacillus*, *Mycoplasma* or *Staphylococcus* which is capable of binding to the above tyrosine derivative in the presence of the above mutant TyrRS, and (C) a desired protein gene having a nonsense mutation at a desired site in animal cells to thereby incorporate the above tyrosine derivative into the nonsense mutation site in the above protein.

(57) 要約: (A)大腸菌由来のチロシルtRNA合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシルtRNA合成酵素と、(B)上記変異TyrRSの存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサーtRNAと、(C)所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法である。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/039989 A1

## 明細書

## 非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法

## 技術分野

本発明は、タンパク質中の所望の部位に、非天然型アミノ酸を取りこませて、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質を発現させる方法、並びに上記タンパク質を発現させるために用いるDNA、発現ベクター、及び動物細胞に関する。

## 背景技術

タンパク質中の所望の位置のアミノ酸残基を、通常のタンパク質合成に関わる20種類以外のアミノ酸（以下、非天然型アミノ酸という）で置換した、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質（以下、アロタンパク質ともいう）は、タンパク質の機能・構造解析の有効な手段となり得る。

アミノアシルtRNA合成酵素（以下、aaRSという）はアミノ酸とtRNAとを特異的に結合させる酵素であり、生物種ごとに、一部の例外を除き天然に存在する20種類のアミノ酸それぞれに対応して20種類存在する。細胞内にはこのようなaaRSが基本的にアミノ酸ごとに存在することで、遺伝暗号に割り当てられるアミノ酸の種類が決まっている。例えば、aaRSの一つであるTyrrRS（以下、TyrrRSという）は、チロシンtRNA（以下、tRNA<sup>Tyr</sup>という）を他のアミノ酸のtRNAから識別してこれにチロシンにしか結合させず、他のアミノ酸とは結合させない。

アロタンパク質を生産するための手法としては、従来より、大腸菌内で生産する方法[コイデ (Koide) ら、Proceedings of the National Academy of Science (PNAS)、USA、第85巻、1988年、p. 6237-41（文献1）]、及び無細胞翻訳系で生産する方法[ノーレン (Noren) ら、Science、第244巻、1989年、p. 182-8（文献2）]が知られていた。

非天然アミノ酸を含む21種類のアミノ酸を含んだタンパク質をさらに大量に調製するためには、非天然型アミノ酸を結合するtRNAが、翻訳反応を行なう

系の中で専用の a a R S によってアミノアシル化される人工遺伝暗号系を構築することが必要である。

このような人工遺伝暗号系の構築のためには、以下の条件を満たす、a a R S ・ t R N A の組を見出すことが必要である：

(1) a a R S は、通常の 20 種類のアミノ酸のいずれかではなく、所望の非天然型アミノ酸と特異的に反応する a a R S 変異体であること；

(2) t R N A は、通常の 20 種類のアミノ酸に割り当てられたコドンではないコドン（例えば、ナンセンスコドンまたは 4 塩基コドンなど）に割り当てられ、かつ、上記非天然型アミノ酸特異的な a a R S 変異体にのみ認識され、宿主の通常の a a R S には認識されない (orthogonal tRNA) ものであること。

このような条件を満たす、人工遺伝暗号系として、非天然型アミノ酸を結合してメッセンジャーRNA上のナンセンス・コドンまで運搬する分子（サプレッサー t R N A 分子）と、サプレッサー t R N A 分子に非天然型アミノ酸を結合させる酵素（a a R S）を用いることができる。このメカニズムについては、[ワング (Wang) ら、サイエンス (Science)、第 292 巻、2001 年、p. 498-500 (文献 3)] 及び [ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティ (Journal of American Chemical Society)、第 124 巻、2002 年、p. 1836-1837 (文献 4)] に記載されている。

そして、このメカニズムによる、具体的な人工遺伝暗号系が、大腸菌内の系、及び小麦胚芽抽出液を利用した無細胞タンパク質合成系で確立されている。

すなわち、大腸菌において、任意の指定する部位に非天然型アミノ酸を含有するタンパク質を生産するシステムとしては、O-メチルチロシンを特異的にアミノアシル化するように改変したメタノコッカスジャナシイ (*Methanococcus jannaschii*) 由来の T y r R S 変異体と、同生物由来のチロシン t R N A を改変したアンバーサプレッサー t R N A を発現させ、O-メチルチロシンがアンバーコードに対応して特異的に導入されることが報告されている (文献 3)。

また、任意の部位に非天然型アミノ酸を含有するタンパク質を小麦胚芽抽出液中で生産するための a a R S が開発されている [キガ (Kiga) ら、プロシーディングス・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proceedings

of the National Academy of Sciences)、USA、第99巻、2002年7月23日、p. 9715-9723 (文献5)]。

このように、大腸菌や無細胞タンパク質合成系では、アロタンパク質生産系が開発されてきたが、これらをそのまま動物細胞内に用いることはできない。すなわち、大腸菌用に開発されたこれらの分子は、いずれもそれらの分子の性質そのものによって動物細胞内では使用することはできない。動物細胞内で任意の指定する部位に非天然型アミノ酸を含有したタンパク質を合成するためには、別途、適当なサプレッサーtRNAと、このサプレッサーtRNA分子と非天然型アミノ酸の両方に特異的なaaRSを開発し、かつ、動物細胞内においてそれら分子の発現が実現されなければならない。

また、上記小麦胚芽抽出液中での無細胞タンパク合成系で用いられたaaRSは、その基質特異性から考えて動物細胞内で使用可能であると予想された。しかし、使用するためには、組み合わせるべきサプレッサーtRNAとその発現系の開発が必要であった。

#### 発明の開示

本発明は、動物細胞内における、非天然アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法、並びに上記タンパク質を発現させるために用いるDNA、発現ベクター、及び動物細胞を提供することを目的とする。

本発明は、下記の発現方法を提供する。

- (1) (A) 大腸菌由来のTyrRSの変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異TyrRS (以下、変異TyrRSという) と、  
(B) 上記変異TyrRSの存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサーtRNAと、  
(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタン

パク質の発現方法。

(2) 上記チロシン誘導体が、3位置換チロシンまたは4位置換チロシンである(1)項に記載の発現方法。

(3) (B) サプレッサー tRNA がバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のサプレッサー tRNA<sup>Tyr</sup> である(1)又は(2)項に記載の発現方法。

(4) (A) 変異 TyrRS が、TyrRS の37位チロシン及び195位グルタミンに相当する位置に改変を受けた変異 TyrRS である(1)～(3)のいずれか一項に記載の発現方法。

(5) (A) 変異 TyrRS が、TyrRS の37位チロシン(Y)に相当する位置が、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)またはアラニン(A)により置換され、かつ TyrRS の195位グルタミン(Q)に相当する位置がアラニン(A)、システイン(C)、セリン(S)、またはアスパラギン(N)で置換された変異 TyrRS である(4)項に記載の発現方法。

(6) 動物細胞が哺乳類細胞である(1)～(5)項のいずれか一項に記載の発現方法。

また、本発明は下記のタンパク質製造方法も提供する。

(7) (1)～(6)のいずれか一項に記載の方法にしたがって発現させたタンパク質を回収し、精製することを特徴とする、非天然型アミノ酸が取りこまれたタンパク質の製造方法。

また、本発明は下記の動物細胞も提供する。

(8) (A) 大腸菌由来の TyrRS の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異 TyrRS を動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(B) 上記変異 TyrRS の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA を、上記動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子を上記動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

とを含有し、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることができる動物細胞。

(9) 上記チロシン誘導体が、3位置換チロシンまたは4位置換チロシンである(8)項に記載の動物細胞。

(10) (B) サプレッサー tRNA がバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のサプレッサー tRNA<sup>Tyr</sup>である(8)又は(9)項に記載の動物細胞。

(11) (A) 変異 TyrRS が、TyrRS の37位チロシン及び195位グルタミンに相当する位置に改変を受けた変異 TyrRS である(8)～(10)項のいずれか一項に記載の動物細胞。

(12) (A) 変異 TyrRS が、TyrRS の37位チロシン(Y)に相当する位置が、バリン(V)、ロイシン(L)、イソロイシン(I)またはアラニン(A)により置換され、かつ TyrRS の195位グルタミン(Q)に相当する位置が、アラニン(A)、システイン(C)、セリン(S)、またはアスパラギン(N)で置換された変異 TyrRS である(11)項に記載の動物細胞。

(13) 哺乳類細胞である(8)～(12)項のいずれか一項に記載の動物細胞。

また本発明は、下記のDNA及び発現ベクターも提供する。

(14) 配列番号1、配列番号30、配列番号31、及び配列番号32からなる群から選ばれる一の配列を有するDNA。

(15) 動物細胞内で認識される制御配列から発現可能に、配列番号1、配列番号30、配列番号31、及び配列番号32からなる群から選ばれる一の配列を含有してなる発現ベクター。

(16) 配列番号1の配列を有するDNAが同方向に9個配列されてクローン化された、(15)記載の発現ベクター。

#### 図面の簡単な説明

図1は、アンバーコドンに相当する、3-コード-1-チロシンのタンパク質への取りこみのための、哺乳類細胞系を示す説明図である。3-コード-1-チロシン(IY)は、培地中に、1-チロシン(Y)とともにあるが、細胞中に取り

こまれた後、特異的な大腸菌変異 *TyrRS* により、*B. s. tRNA<sup>Tyr</sup>* (*Bacillus stearothermophilus* の *tRNA<sup>Tyr</sup>*) に結合する。

図2は、大腸菌 *tRNA<sup>Tyr</sup>* 由来のサプレッサー *tRNA<sup>Tyr</sup>* と、*Bacillus stearothermophilus* の *tRNA<sup>Tyr</sup>* 由来のサプレッサー *tRNA<sup>Tyr</sup>* の配列及び構造を示す。図2において、 $s^4U$  は4-チオウリジン、 $Gm$  は2'-O-メチルグアノシン、 $ms^2t^6A$  は2-メチルチオ-N<sup>6</sup>-イソペンテニルアデノシン、 $T$  は5-メチルウリジン、 $\Psi$  はシュドウリジン、 $m^1A$  は1-メチルアデノシンを示す。

図3は、直列に9コピーの *Bacillus stearothermophilus* サプレッサー *tRNA<sup>Tyr</sup>* を有するプラスミドの構成を示した図である。

図4Aと図4Bは、CHO細胞中のアンバー変異を検出するための、抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロットのゲルの写真である。

図5Aと図5Bは、アンバーサプレッションの検出のためのウェスタンブロットの写真である。

図6A、図6B、及び図6Cは、*ras* 及び *ras(Am)* 産物の LC-MS 分析の結果を示すグラフである。

図7は、*Ras* タンパク質の3-ヨード-L-チロシンの取りこみについて、誘導可能なアンバーサプレッションのウェスタンブロットの写真である。

図8は、大腸菌の *TyrRS* (野生型) のアミノ酸配列 (1文字表記) を示す図である。

図9は、TetBst0、TetBst1、及びTetBst2の概略図である。

図10Aと図10Bは、本発明の実施例において、サプレッション効率を比較した結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の発現方法は、

(A) 原核生物由来の *TyrRS* の変異体であって、チロシンに対する特異性において非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異 *TyrRS* と、

(B) 上記変異  $TyrRS$  の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー  $tRNA$  と、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、上記タンパク質のナンセンス変異の位置にチロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法である。

次に、本発明の発現方法で用いられる、変異  $TyrRS$ 、サプレッサー  $tRNA$  について詳述する。

#### (1) 変異 $TyrRS$

本発明において、チロシンよりも所望のチロシン誘導体に対する基質親和性が高められたとは、目的のチロシン誘導体に対する活性値（反応速度  $K_{cat}$  をミカエリス定数  $K_m$  で割った値）が、チロシンに対する活性値よりも大きいものをいう。活性値はインビトロのアッセイによって測定できるが、遺伝学的なデータから活性値の相対的な大きさを判定することもできる。

本発明で用いられる変異  $TyrRS$  は、アミノ酸として、チロシン誘導体の特異的に認識し、かつ  $tRNA$  として、併用するサプレッサー  $tRNA$  を特異的に認識して、チロシン誘導体が結合したサプレッサー  $tRNA$  を生成させることができる大腸菌由来  $TyrRS$  の変異体である。大腸菌としては、K12株、B株を挙げることができる。

大腸菌由来の  $TyrRS$ （野生型）は、真核生物の  $tRNA^{Tyr}$  と反応せず、大腸菌由来の  $tRNA^{Tyr}$  は真核生物の  $TyrRS$  と反応しない。

上記チロシン誘導体としては、チロシンのフェニル基の3位または4位に置換基を有する3位置換チロシン、4位置換チロシンが挙げられる。

3位置換チロシンとしては、3-ヨードチロシン、3-ブロモチロシンなどの、3-ハロゲン化チロシンが挙げられる。また4位置換チロシンとしては、4-アセチル-L-フェニルアラニン、4-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニン、O-メチル-L-チロシン、4-ヨード-L-

フェニルアラニンなどが挙げられる。

これらのアミノ酸は、公知の方法で作製することができ、あるいは市販のものを利用することができる。例えば、4-アセチル-L-フェニルアラニンは、バイオケミストリー (Biochemistry)、42巻、6735-6746頁、2003年に記載の方法に従って作製することができる。また、4-ベンゾイル-L-フェニルアラニンと4-アジド-L-フェニルアラニンはBachem社 (ドイツ) より、O-メチル-L-チロシンと4-ヨード-L-フェニルアラニンはSigma社 (米国) より市販されているものを用いることができる。

これらはそれ自体で生理活性を有する非天然型アミノ酸であり、タンパク質の部位特異的ラベルの標的ともなるので、例えば、3-ハロゲン化チロシンを組み込んだタンパク質は、タンパク質機能・構造解析の材料として有用であり、また創薬のターゲットともなる可能性がある。

大腸菌のTy r R S (野生型) のアミノ酸配列 (配列番号29) を1文字表記で図8に示す。

本発明に用いられる変異Ty r R Sは、例えば、すでに知られている他のTy r R SとチロシルAMPの複合体との3-D構造データ (例えば、Brickら、J.Mol.Bio.、第208巻 (1988) p. 83に記載されている3-D構造データ) から得られるチロシルAMPを認識する位置を参照した上で、図8の配列の中で、チロシン誘導体を認識する変異を導入すべき位置を推定して、後述する周知の部位特異的に変異を導入する方法により、得ることができる。

そして、好ましくは、本発明に用いられる変異Ty r R Sとしては、この配列の中で、少なくとも、37位のチロシン (Y) と195位のグルタミン (Q) に相当する位置を他のアミノ酸で部位特異的に置換して、3-ハロゲン化チロシンへの特異性を付与した変異体が挙げられる (文献5参照)。

さらに好ましくは、37位チロシン (Y) に相当する位置が、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) により置換され、かつ195位グルタミン (Q) に相当する位置がアラニン (A)、システイン (C)、セリン (S)、またはアスパラギン (N) で置換されたものを用いることができる。これらの変異により3-ヨード-L-チロシンへの特異性が高められること

を検証した結果を、表 1 に示す。表 1 は、アミノアシル化反応の反応産物の 1 つであるピロリン酸をピロホスファターゼで分解して生産される無機リン酸を定量するロイドらの方法 (Lloyd ら、Nucleic Acids Research vol23(1995) pp2886-2892) を簡略化し、無機リンをBiomol green (フナコシ) を使用して検出することで、アミノアシル化反応の測定を行なったものである。

表 1

チロシン、3-ヨードチロシンでの TyrRS 変異体の活性

酵素	アミノ酸		酵素	アミノ酸	
	チロシン	3-エ-ド・L-チロシン		チロシン	3-エ-ド・L-チロシン
野生型 (V37, Q195)	+++	-	V37	+++	+++
A37A195	-	-	I37A195	+	+
A37C195	+	++	I37C195	-	-
A37N195	-	-	I37N195	-	-
A37S195	+	+	I37S195	-	-
V37A195	+	++	L37A195	+	+
V37C195	+	++	L37C195	+	+
V37N195	+	++	L37N195	+	-
V37S195	++	++	L37S195	-	-

「+++」: 酵素濃度 0. 05  $\mu$ M で活性が検出されたことを示す。

「++」: 酵素濃度 0. 25  $\mu$ M で活性が検出されたことを示す。

「+」: 酵素濃度 0. 25  $\mu$ M で、「++」よりも低い活性が検出されたことを示す。

「-」: 酵素濃度 0. 25  $\mu$ M で活性が検出されないことを示す。

中でも、表1の結果から、37位がバリンで195位がシステイン（V37C195と称する）の変異体、37位がバリンで195位がアスパラギン（V37N195と称する）の変異体、37位がバリンで195位がアラニン（V37A195と称する）の変異体、37位がアラニンで195位がシステイン（A37C195と称する）の変異体が特に好ましい。

次に、これらの変異体を製造する方法としては、公知の遺伝子操作技術により行なうのが好ましい。例えば、目的のアミノ酸の位置をコードする塩基配列を改変すべきアミノ酸をコードする塩基配列に置換したプライマーを用いて、改変すべきアミノ酸をコードする塩基配列に置換したDNAを増幅させて、増幅させたDNA断片を結合させて、全長のa a R Sの変異体をコードするDNAを得て、これを大腸菌などの宿主細胞を用いて発現させることにより簡便に製造することができる。この方法において使用するプライマーとしては20～70塩基、好ましくは20～50塩基程度である。このプライマーは改変前の元の塩基配列とは1～3塩基がミスマッチとなるので、比較的長いもの、例えば20塩基以上のものを使用するのが好ましい。

より具体的に示すと、文献5に記載された方法にしたがって、大腸菌ゲノムDNAを鋳型とし、次のプライマー（1）、（2）を用いたPCRによって増幅した断片を、NdeI及びHindIIIで切断した後に、pET26bのNdeI-HindIII部位に組み込むことで、TyrRSの発現ベクターpRT-YRSを作製する。大腸菌ゲノムDNAを鋳型にするとは、0.1mL程度の大腸菌培養液から回収した大腸菌を95℃で10分間加熱したものをPCR反応液に加えることである。

プライマー（1）：GGAATTCCATATGGCAAGCAGTAACTTGATTAAACAATTGCAAG  
（配列番号2）

プライマー（2）：GCCGAAGCTTGTCGACTTTCAGCAAATCAGACAGTAATTCTTTTACCG  
（配列番号3）

次に37位及び195位のアミノ酸を部位特異的に改変する方法の一例を説明

する。

まず、37位または195位の1箇所のみのアミノ酸の置換体を作製する。37位及び195位それぞれの1個のアミノ酸の置換体をコードするDNA配列を作製するために使用するプライマー(3)から(8)は以下の通りである。

プライマー(3) : AGGATCGAAGCCGCAAGCGAGCGGATCGGGCCTTGCGCC  
(配列番号4)

プライマー(4) : AGGATCGAAGCCGCAMNNGAGCGGATCGGGCCTTGCGCC  
(配列番号5)

MはCまたはAを示し、NはAまたはCまたはGまたはTを示す。

プライマー(5) : ACGGTGTGGTGCTGTCTATTGGTGGTTCTGACC  
(配列番号6)

プライマー(6) : ACGGTGTGGTGCTGGCAATTGGTGGTTCTGACC  
(配列番号7)

プライマー(7) : ACGGTGTGGTGCTGAACATTGGTGGTTCTGACC  
(配列番号8)

プライマー(8) : ACGGTGTGGTGCTGTGCATTGGTGGTTCTGACC  
(配列番号9)

次に、37位及び195位の両方のアミノ酸が改変された二アミノ酸置換体を作製する。

上記の工程で作製した37位および195位それぞれの一アミノ酸置換体をコードするプラスミドから、プライマーを用いたオーバーラップ・エクステンション

ン法で二アミノ酸置換体をコードするDNA配列を作製し、pET-YRSのNdeI-BamHI部位に導入する。オーバーラップ・エクステンション法はプライマー(1)と(10)の組、プライマー(9)と(11)の組をそれぞれ用いて増幅した2つの断片を精製し、これらとプライマー(1)と(9)を用いたPCRで増幅することによって行なうことができる。

プライマー(1) : GGAATTCATATGGCAAGCAGTAACTTGATTAAACAATTGCAAG  
(配列番号2)

プライマー(10) : GATCATCTGGTTAACGGAGAAGTGTTCGCC  
(配列番号11)

プライマー(9) : TTCTTCGGATCCAACCAGACTGCGCCGCCTTC  
(配列番号10)

プライマー(11) : GACCTTCCTGTGCGATATTGGCAAAC  
(配列番号12)

上記工程で得られた完全な変異DNAフラグメントの各々を、プラスミドpET-YRS内のテンプレートフラグメントのもとの位置に挿入し、変異Ty r R S遺伝子を含むプラスミドで、ハナハンの方法(Hanahan, D (J. Mol. Biol., 166, 557-580))に準じた形質転換法により、各々大腸菌BLR(DE3)に導入する。各々のプラスミドを有する形質転換体を単離し培養することにより、変異Ty r R Sを大腸菌内で発現させることができる。

さらに、変異Ty r R Sを製造する方法としては、上記方法に限定されるものではなく、公知のポイントミューテーション技術や、制限酵素により改変断片を導入する方法等、種々の遺伝子操作技術を使用することができる。

## (2) サプレッサーtRNA

上記変異 T y r R S と組み合わせて使用される、サプレッサー t R N A は、通常の 20 種類のアミノ酸に割り当てられたコドンではないナンセンスコドンに割り当てられ、かつ、上記非天然型アミノ酸特異的な T y r R S 変異体にのみ認識され、宿主の通常の a a R S には認識されない (orthogonal tRNA) という要件を備え、かつ真核細胞中で発現しなければならない。

ここで、ナンセンスコドンとしては、U A G (アンバー)、U A A (オーカー)、U G A (オパール) が挙げられるが、U A G (アンバー) コドンを用いることが好ましい。

本発明者らは、まず、上記大腸菌由来の変異 T y r R S と組み合わせるサプレッサー t R N A としては、同じ大腸菌由来のものが適していると考え、この大腸菌由来のサプレッサー t R N A<sup>Tyr</sup>を、真核細胞内で発現させることを考えた。大腸菌 t R N A<sup>Tyr</sup>由来のサプレッサー t R N A<sup>Tyr</sup>の配列及び構造は、すでに知られている (M.Sprinzlら、Nucleic Acids Research 17, 1-172(1989))。これを図 2 に示す。

一般に、真核細胞での t R N A の発現は、t R N A コーディング配列内の 2 つの内部プロモーターを必要とし、そのコンセンサス配列は、ボックス A、ボックス B として知られている。ボックス A のコンセンサス配列 (TRGCNNAGYNGG ; 配列番号 13) は、8 位～16 位の TRGCNNAGY と 18 位～19 位の GG であり、ボックス B のコンセンサス配列は 52 位～62 位の GGTTCGANTCC (配列番号 14) であり、図 2 において○で囲んだ配列である。またボックス B のコンセンサス配列は、AGTTCGANTCT (配列番号 20) でもよい。

図 2 に示すように、大腸菌サプレッサー t R N A<sup>Tyr</sup>は、配列内にボックス B コンセンサス配列は有しているが、ボックス A コンセンサス配列は含まない。よって、この大腸菌サプレッサー t R N A<sup>Tyr</sup>を真核細胞内で発現させるために、U9 と C10 を A と G で各々置換し、ボックス A のコンセンサス配列を作製し (図 2)、これに伴い生じるミスマッチ塩基対、G10-G25 は、G25C 置換で修正した。すると、後述の比較例で示すように、上記変異大腸菌由来 T y r R S と組み合わせても、サプレッション活性を示さないことがわかった。

これに対し、*Bacillus stearothermophilus* のサプレッサー t R N A<sup>Tyr</sup>では、

原核生物由来であるが、そのサプレッサー tRNA<sup>Tyr</sup>配列内にボックス B とボックス A を内部に有している (M. Sprinzl ら、Nucleic Acids Research 17, 1-172(1989)) (図 2 参照) ことに着目し、なんら改変を加えなくても真核生物内で発現させることができると考えた。

そして実際に、*Bacillus stearothermophilus* 由来のサプレッサー tRNA<sup>Tyr</sup> を改変せずに動物細胞で導入するためのベクターにクローン化して動物細胞に導入したところ、動物細胞中での発現が確認された (後述の実施例参照)。そして、上記大腸菌の Tyr R S と組み合わせて、サプレッション活性を示すことを確認した (後述の実施例参照)。

すなわち、ボックス A 配列とボックス B 配列を有した形で、サプレッサー活性を保持できる原核生物のサプレッサー tRNA は、上記大腸菌由来の変異 Tyr R S と組み合わせて、真核生物内でサプレッサー活性を有することができることを見出した。

したがって、本発明の発現方法に用いられるサプレッサー tRNA は、上記変異 Tyr R S の存在下でチロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA である。これらの tRNA の配列については、<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/trnabase/> または <http://www.staff.uni-bayreuth.de/~btc914/search/> に記載されている。

これらは、原核生物中で機能するサプレッサー tRNA の配列を有し、かつ内部に真核生物において認識される 2 つの内部プロモーターコンセンサス配列を有し、上記変異 Tyr R S の存在下でチロシン誘導体と結合可能なサプレッサー tRNA である。ここで、「原核生物中で機能するサプレッサー tRNA の配列を有」するとは、原核生物由来のサプレッサー tRNA であって、サプレッサー tRNA として機能するための、ナンセンスコドン (通常アンバーコドン (UAG)) に相補的なアンチコドン及び立体構造 (L 型構造部分) を保持していることを意味する。また、「内部に真核生物において認識される 2 つの内部プロモーター配列を有」するとは、上記ボックス A のコンセンサス配列 (配列番号 13) とボックス B のコンセンサス配列 (配列番号 14 または配列番号 20) を内部に含むこ

とを意味する。また、「上記変異 T y r R S の存在下でチロシン誘導体と結合可能」とは、変異 T y r R S により特異的に認識されてチロシン誘導体と結合することができるサプレッサー t R N A であり、通常チロシンと結合する t R N A<sup>T y r</sup>由来のサプレッサー変異体で、チロシン誘導体、好ましくは 3 位置換チロシンと結合可能なものが用いられる。

バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌 t R N A<sup>T y r</sup>由来のサプレッサー t R N A の例としては、*Bacillus stearothermophilus* の t R N A<sup>T y r</sup>由来のサプレッサー t R N A、*Bacillus subtilis* の t R N A<sup>T y r</sup>由来のサプレッサー t R N A (<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/trnabase/>、登録番号DY1540 ; E. F. Wawrousek ら、(1984) J. Biol. Chem. 259, 3694-3702 参照)、*Mycoplasma capricolum* の t R N A<sup>T y r</sup>由来のサプレッサー t R N A (<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/trnabase/>、登録番号DY1140 ; Y. Andachi ら、(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7398-7402 参照)、*Staphylococcus aureus* の t R N A<sup>T y r</sup>由来のサプレッサー t R N A (<http://medlib.med.utah.edu/RNAmods/trnabase/>、登録番号DY1480 ; C. Green、(1993) J. Bacteriol. 175, 5091-5096 参照) が挙げられ、好ましくは *Bacillus stearothermophilus* の t R N A<sup>T y r</sup>由来のサプレッサー t R N A が用いられる。

### (3) 変異 T y r R S、サプレッサー t R N A の動物細胞中での発現

変異 T y r R S を動物細胞中で発現させるためには、いかなる公知の発現系でも用いることができ、例えば市販の p C D N A 3. 1 (Invitrogen 社製)、p A G E 1 0 7 (Cytotechnology, 33, (1990))、p A G E 1 0 3 [J. Biochem. 101, 1307(1987)] などを用いることができる。また、サプレッサー t R N A はいかなる公知の大腸菌クローニング用ベクターを用いても動物細胞内で発現させることができる。例えば、p B R 3 2 2 (Sutcliffe, J. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3737-3741(1978)) などを用いることができる。

変異 T y r R S については、必要に応じて、誘導発現可能なベクターを用いることができ、たとえば、Clontech 社、Invitrogen 社などから市販されている、テトラサイクリン応答プロモーターを用いることができる。

細胞へのベクターの導入方法としては、例えば、電気穿孔法 (Chu, Nucl. Acids Res. 15,1311-1326(1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, Mol. Cell Biol. 7,2745-2752(1987))、リポフェクション法 (Derijard, Cell 7,1025-1037(1994); Lamb, Nature Genetics 5,22-30(1993)) などが挙げられる。

#### (4) 非天然型アミノ酸を組み込ませるためのタンパク質

本発明で非天然型アミノ酸を組み込ませるタンパク質の種類は、限定されるものではなく、発現可能ないかなるタンパク質でもよく、異種の組換えタンパク質でもよい。

本発明において非天然型アミノ酸を組み込ませる位置にナンセンスコドン (サブプレッサーもRNAがアンバーサブプレッサーのときはアンバーコドン) を導入することが必要であり、これによりこのナンセンスコドン (アンバーコドン) 部位に特異的に非天然型アミノ酸を組み込むことができる。

タンパク質に部位特異的に変異を導入する方法としては、周知の方法を用いることができ、特に限定されないが、Hashimoto-Gotoh, Gene 152,271-275(1995)、Zoller, Methods Enzymol.100,468-500(1983)、Kramer, Nucleic Acids Res.12, 9441-9456(1984)、Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488-492(1985)、「細胞工学別冊「新細胞工学実験プロトコール」、秀潤社、241-248頁(1993)」に記載の方法、または「QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit」(Stratagene社製)を利用する方法などに準じて、適宜実施することができる。

本発明は動物細胞内で発現させることができるので、これまで、大腸菌や無細胞タンパク質系では、発現しない、あるいは発現量が低い、または活性型となるための翻訳後の修飾を受けることができないようなタンパク質へ、非天然型アミノ酸を取りこませることができる。このようなタンパク質としては、当業者には種々のものが知られているが、例えば、ヒト上皮成長因子受容体細胞外ドメイン (H.Ogisoら、Cell, 110, 775-787(2002))、ヒトGroucho/TLE1タンパク質 (L. Picklesら、Structure 10, 751-761(2002))、ラット筋肉特異的キナーゼ (J. Tillら、Structure 10, 1187-1196(2002)) などについて、非天然型アミノ酸を取りこんだアロタンパク質を合成することができるが、これらに限定されるもので

はない。

また、本発明の方法においては、動物細胞内でアロタンパク質を発現させるので、糖鎖と結合した糖タンパク質に非天然型アミノ酸を取りこませることもできる。特に、無細胞タンパク質系における糖鎖付加のパターンが、本来のパターンと異なるようなタイプの糖タンパク質の場合には、本発明の動物細胞内での系は、目的の（本来の）パターンの糖鎖が付加されたアロタンパク質を得るための有効な手段と考えられる。

#### （５）宿主

本発明の別の態様は、本発明の発現方法に用いることのできる、組換え動物細胞であって、上記 a a R S、サプレッサー t R N A 及び非天然型アミノ酸を取りこませたい位置にアンバー変異を導入した所望のタンパク質遺伝子を導入した動物細胞である。

本発明に用いられる、宿主の動物細胞としては、遺伝子組換え系が確立されている、哺乳類細胞が好ましい。有用な哺乳動物宿主細胞系の実例は、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）と C O S 細胞を含む。より特異的な例は、S V 4 0 によって形質転換したサル腎臓 C V 1 系（C O S - 7, ATCC CRL 1651）；ヒト胚腎臓系（2 9 3 又は懸濁培養での増殖用にサブクローンした 2 9 3 細胞、Graham ら、J. Gen Virol., 36:59(1977)）；チャイニーズハムスター卵巣細胞/-D H F R（C H O、Urlaub と Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980)）；マウスセルトーリ細胞（T M 4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251(1980)）；ヒト肺細胞（W 1 3 8, ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2, HB 8065）；及びマウス乳癌（M M T 060562, ATCC CCL51）を含む。これらの宿主は、各々発現系が確立されており、適切な宿主細胞の選択は、当業者の技術範囲内である。

これらは、例えば、Molecular Cloning 第 2 版、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)などに記載された方法に準じて行なうことができる。

次に、上記この本発明の発現方法によって、非天然型アミノ酸取りこみタンパク質が発現する様子を、図 1 に従って説明する。図 1 の枠は、動物細胞（例えば Chinese hamster ovary 細胞（以下、C H O 細胞））の細胞膜を表している。細胞

内（枠の内側）では、サプレッサー tRNA<sup>Tyr</sup>（“*B. s. tRNA<sup>Tyr</sup>*” と表示）と aaRS（“*E. coli* 変異体 TyrRS” と表示）がそれぞれの発現系から発現している。非天然型アミノ酸である 3-ヨード-L-チロシンは培地（枠の外側）中に加えられる。

培地中の 3-ヨード-L-チロシンは細胞自身の働きで細胞内に取り込まれ、大腸菌変異体 TyrRS の働きによって *B. s. tRNA<sup>Tyr</sup>* に結合する。その後、3-ヨード-L-チロシンは、*B. s. tRNA<sup>Tyr</sup>* によってリボソーム上に運ばれて、ナンセンス・コドン（ここでは、UAG コドン）の翻訳に用いられる。望みの任意の位置に 3-ヨード-L-チロシンを含有するタンパク質を生産するためには、タンパク質の遺伝子の該当位置のコドンを UAG に置換した後に、この遺伝子を細胞内で発現させる。

こうして、本発明の発現方法によれば、動物細胞内において、目的の位置にチロシン誘導体が組み込まれた目的のタンパク質を発現させることができる。

すなわち、（A）大腸菌由来の TyrRS の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異 TyrRS を動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

（B）上記変異 TyrRS の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサー tRNA を、上記動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

（C）所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを有する動物細胞を、その動物細胞の増殖に適した培地（例えば、CHO 細胞の場合、Opti-MEM I（Gibco BRL 社）など）に目的のチロシン誘導体を添加した培地で、適当な条件でインキュベートする。例えば、CHO 細胞の場合は、37℃ 程度の温度で、24 時間程度、インキュベートする。培地内のチロシン誘導体の添加量は、0.1 – 3 mM 程度、好ましくは 0.3 mM 程度とする。

本発明の別の態様は、上記の発現方法にしたがって発現させたタンパク質を回収し、精製する、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の製造方法である。

発現したアロタンパク質は、培地又は宿主細胞溶解物から回収し得る。もし膜に結合しているならば、それは適当な洗剤溶液（例えば Triton-X100）を用いて又は

酵素的な切断によってその膜から離すことができる。細胞は、凍結-融解サイクル、音波処理、機械的粉碎、又は細胞溶解剤のような各種の物理的・化学的手段によって破碎することができる。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まない、またはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

タンパク質の単離・精製としては、生産したタンパク質特有の性質に基づき、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈澱、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

本発明の別の態様は、下記の配列番号 1 の配列を有する DNA である。

AGCGCTCCGGTTTTTCTGTGCTGAACCTCAGGGGACGCCGACACACGTACACGTCGGAGGGGTAGCGAAGTG  
GCTAAACGCGCGGACTCTAAATCCGCTCCCTTTGGGTTGGGCGGTTTGAATCCGTCCCCCTCCAGACAAGT  
GCGGTTTTTTTCTCCAGCTCCCG

(配列番号 1)

この配列番号 1 の配列は、ヒトの tRNA 遺伝子のリーダー配列（配列番号 1 の塩基 1～55）と、*Bacillus stearothermophilus* の tRNA<sup>Tyr</sup> 遺伝子のアンチコドン部分を CUA に置換した上で、末端の CCA 配列を削った塩基配列（下線部；配列番号 1 の塩基 56～137）、および転写ターミネーター（配列番号 1 の塩基 138～167）をこの順番に連結した人工的な塩基配列である。

配列番号 1 の配列を有する DNA は、クローニングのため（その DNA の増幅）又は発現のために複製可能ベクターに挿入し得る。各種のベクターが利用可能である。該ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、又はファージの形態とし得る。その適切な核酸配列は、各種の手法によって該ベクター内に挿入し得る。一般に、DNA は、当該分野で周知の技術を用いて適当な制限エ

ンドヌクレアーゼ部位に挿入される。ベクター構成要素は、一般に、制限されることなしに、1以上のシグナル配列、複製の起点、マーカー遺伝子などを含む。これらの1以上の構成要素を含む適当なベクターの構築は、当業者に周知の技術である。

この発現ベクターを動物細胞中に導入することにより、サプレッサー tRNA を動物細胞中で発現させることができる。すなわち、配列番号1の配列を含むベクターは、動物細胞内で認識される制御配列として、ボックスA、B及び5'側のリーダー配列を有しているので、ひとたびベクターが動物細胞内に導入されれば、これらの制御配列から、当該サプレッサー tRNA が動物細胞中で発現させることができる。

したがって、この発現ベクターは、上記非天然型アミノ酸取りこみタンパク質の発現方法に用いることが可能であるばかりでなく、動物細胞中のナンセンス変異のサプレッションを可能にするので、ナンセンス変異に関連する疾患などの遺伝子治療に用いられる可能性がある。

クローニングベクターは、選択した宿主細胞の1以上の中でそのベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。また、発現ベクターはそのような配列を含んでもよい。そのような配列は、各種の細菌、酵母、及びウイルスについて良く知られている。各種のウイルス起点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV、又はBPV)は、哺乳動物細胞中のクローニングベクターに有用である。

発現及びクローニングベクターは、典型的に選択可能マーカを含む。典型的な選択遺伝子は、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、DHFR遺伝子又はチミジンキナーゼ遺伝子などである。野生型DHFRが用いられる場合に適当な宿主細胞は、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980)によって記載されるように製造され且つ増殖された、DHFR活性が不足したCHO細胞系である。

組換え脊椎動物細胞培養における合成への適合のために好適な更に他の方法、ベクター、及び宿主細胞は、Gethingら、Nature, 293:620-625(1981); Manteiら、Nature, 281:40-46(1979)などに記載されている。

遺伝子増幅/発現は、直接試料で、例えば、ここに提供した配列に基づいて、

適切に標識したプローブを用いて、通常のサザンブロット法、mRNAの転写を定量するためのノーザンブロット法[Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205(1980)]、ドットブロッティング(DNA分析)、又はin situハイブリダイゼーションで測定し得る。あるいは、抗体は、DNA二本鎖、RNA二本鎖、及びDNA-RNAハイブリッド二本鎖又はDNA-タンパク質二本鎖を含む特異的二本鎖を認識できるそれを利用し得る。その結果抗体は、標識されて良く、且つ該アッセイは、その二本鎖がその表面上に二本鎖の形成において、該二本鎖に結合した抗体の存在が検出できるように表面に結合される場合、実行し得る。

あるいは遺伝子発現は、細胞の免疫組織学的染色又は組織切片のような免疫学的方法及び遺伝子生成物の発現を直接定量するため、細胞培養又は体液のアッセイによって測定し得る。流体試料の免疫組織学的染色のために有用な抗体は、モノクローナル又はポリクローナルのいずれかとして良く、また何れの哺乳動物においても作製し得る。

以下、実施例に基づき、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、本明細書において、引用した文献は、その全体が参照としてここに取り込まれるものとする。

#### 実施例 1 : 3-ヨードチロシン組み込みタンパク質の発現

本実施例では、32番目のコドンにUAGに置換したRasタンパク質遺伝子をCHO細胞内で発現させて、該当部位に3-ヨードチロシンを含有したRasタンパク質を生産した。

本実施例では、サプレッサーtRNAを恒常的に発現させる一方で、これに非天然型アミノ酸を結合させる変異TyrRSについては、テトラサイクリンを培養液に加えることで発現誘導を行なった。

##### (1) サプレッサーtRNA

サプレッサーtRNAとして用いた*B. s.* tRNA<sup>Tyr</sup>の遺伝子(167残基)の塩基配列は以下の通りである。

AGCGCTCCGGTTTTTCTGTGCTGAACCTCAGGGGACGCCGACACACGTACACGTCGGAGGGGTAGCGAAGTG  
GCTAAACGCGGCGGACTCTAAATCCGCTCCCTTTGGGTTCGGCGGTTTGAATCCGTCCCCCTCCAGACAAGT  
GCGGTTTTTTTTCTCCAGCTCCCG

(配列番号 1)

この配列は、ヒトの tRNA 遺伝子のリーダー配列 (H. van Tol ら、EMBO J. 6, 35-31(1987)) と、*Bacillus stearothermophilus* の tRNA<sup>Tyr</sup> 遺伝子のアンチコドン部分を CUA に置換した上で、末端の CCA 配列を削った塩基配列 (下線部)、および転写ターミネーター (H. van Tol ら、EMBO J. 6, 35-31(1987)) をこの順番に連結した人工的な塩基配列である。

この配列番号 1 の配列を有する一本鎖 DNA は、PCR プライマーなどの一本鎖 DNA の合成を行なう、広く利用されている商業的サービス (シグマ・ジェノシス・ジャパン株式会社) によって化学合成品として得た。この DNA を鋳型にして、次の (1) (2) の 2 つのプライマーを用いた PCR によって増幅した DNA 断片を、EcoRI 及び HindIII で切断した後に、pBR322 の EcoRI-HindIII 部位に組み込むことでクローン化を行なった。

プライマー (1) : CACAGAATTCTCGGGAGCTGGAGAAAAAAC (配列番号 2 1)

プライマー (2) : CACAAAGCTTAGCGCTCCGGTTTTTCTGTG (配列番号 2 2)

そして、*B. stearothermophilus* のサブレッサー tRNA<sup>Tyr</sup> 遺伝子が同じ方向に 9 つコピーした遺伝子クラスターを以下の 2 つのステップにより構築した (図 3)。

まず、3 つの異なるプライマーセット 1~3 のプライマー (1) (2) をそれぞれ用いて、以下の通りの PCR を、GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いて行なった。

第 1 の反応は、

第 1 セットのプライマー (1) :

AGCGAGTGTTAACCTGCCTAGCGCTCCGGTTTTTCTGTG (配列番号 2 3)

第 1 セットのプライマー (2) :

ACACACCCAGCAGACTGGCGGGAGCTGGAGAAAAAAC (配列番号 24)

を用いて、通常の反応条件にてPCRを行ない、配列番号1の配列を有するDNAの上流に、プライマー結合部位pbs1 (配列番号15) を、このDNAの下流に、BstXI-1部位 (CCAGCAGACTGG: 配列番号17) を有する断片を作製した。

第2の反応は、

第2セットのプライマー (1) :

ACACACCCAGCAGACTGGAGCGCTCCGGTTTTTCTGTG (配列番号 25)

第2セットのプライマー (2) :

ACACACCCAGCTTCCTGGCGGGAGCTGGAGAAAAAAC (配列番号 26)

を用いて通常のPCRに用いられる反応条件にてPCRを行ない、配列番号1の配列を有するDNAの上流に、BstXI-1部位 (配列番号17) を、このDNAの下流に、他のBstXI部位、CCAGCTTCCTGG (BstXI-2; 配列番号18) を有する断片を作製した。

第3の反応は、

第3セットのプライマー (1) :

ACACACCCAGCTTCCTGGAGCGCTCCGGTTTTTCTGTG (配列番号 27)

第3セットのプライマー (2) :

CTGCGCAATATCGTAGTCGCGGGAGCTGGAGAAAAAAC (配列番号 28)

を用いて通常のPCRに用いられる反応条件にてPCRを行ない、配列番号1の配列を有するDNAの上流に、BstXI-2部位 (配列番号18)、下流に他のプライマー結合部位pbs2 (配列番号16) を有する断片を作製した。

これら3つのPCR産物は、公知の技術によって、リガーゼを用いて互いに連結して、tRNA遺伝子の3つのコピーからなるサブクラスターを作製した。

このサブクラスターを、pbs1 (配列番号15) の配列にEcoRI制限部位を生成するための配列が付加されたプライマーと、pbs2 (配列番号16) の配列にHindIII制限部位を生成するための配列が付加されたプライマーを用いて、両端部に、各々、EcoRIとHindIII部位が付加されたサブクラスターの断片として、増幅した。

さらに、同様にして、両端に各々HindIIIとEcoRI部位が付加された断片、両端に各々EcoRIとBamHI部位が付加されたサブクラスターの断片を、作製した。こうして、最終的に、制限部位の異なる組み合わせを有する3つのタイプのサブクラスターを作製した。これらのサブクラスター1～3を、リガーゼによって互いに連結し、さらにpBR322(宝酒造株式会社)のEcoRIとBamHI部位の中にクローン化して、9コピーの*Bacillus stearothermophilus*サブレッサー tRNA<sup>Tyr</sup>遺伝子を有するプラスミドpBstRNAを作製した。

得られたクローン化断片の構造を図3に示す。

図3において、pbs1、pbs2、BstX-1、およびBstX-2の塩基配列は次の通りである。

pbs1 : AGCGAGTGTTAACCCTGCCT (配列番号15)

pbs2 : CGACTACGATATTCGCGCAG (配列番号16)

BstX-1 : CCAGCAGACTGG (配列番号17)

BstX-2 : CCAGCTTCCTGG (配列番号18)

プラスミドpBstRNAは、9コピーの*Bacillus stearothermophilus*サブレッサー tRNA<sup>Tyr</sup>遺伝子を有するので、動物細胞内での*Bacillus stearothermophilus*サブレッサー tRNA<sup>Tyr</sup>遺伝子の発現量を高めることができ、動物細胞内で非天然型タンパク質を発現させるために有用である。

## (2) 変異TyrRS

大腸菌 変異体 TyrRS (以下、TyrRS (V37C195) という) の遺伝子の塩基配列は、文献5に記載されている。

上述の方法で、37位または195位のそれぞれのアミノ酸の1個が置換された一アミノ酸置換体をコードするDNA配列を、上記プライマー(3)から(8)を用いて作製した。プライマー(3)及び(4)は、37位の改変のためのものである。またプライマー(5)から(8)は195位の改変のためのものである。

ついで、37位および195位それぞれの一アミノ酸置換体をコードするプラスミドから、プライマー(1)と(10)の組、プライマー(9)と(11)の

組をそれぞれ用いて増幅した2つの断片を精製し、これらのプライマー(1)と(9)を用いたPCRで増幅することによって、2つの断片を連結した。

PCR増幅物を、ベクターpcDNA4/T0 (Invitrogen社)のマルチプルクローニング部位に挿入してプラスミドpEYSM1を作製した。

### (3) 哺乳類細胞でのアンバーサプレッション

LipofectAMINE 2000(Gibco BRL)の方法に従って、35 mmプレート当たり、各プラスミドについて0.5 – 2  $\mu$ gのDNAを用いてトランスフェクションを行なった。Opti-MEM 1(Gibco BRL)を、培地として用いた。細胞抽出物を、トランスフェクションの24時間後に調製し、SDS-PAGEに供し、その後、抗-FLAGM2抗体(Sigma)と、ECL+免疫検出システム(Amersham Pharmacia Biotech)を用いてウェスタンブロッティングを行なった。バンドの強度をイメージアナライザー、LAS-1000plus(富士フイルム)を用いて測定した。ras(Am)産物及び比較のための野生型ras産物(各0.5  $\mu$ g)を、抗-FLAG M2抗体アフィニティゲル(Sigma)を用いて、1から5の培養プレート(100 mm径)で各々精製した。液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレー質量分析(LC-MS)とタンデム質量分析シーケンシングを行なった。

### (4) CHO-Y細胞

TyrRS (V37C195)を安定に保持するCHO-Y細胞を創るため、テトラサイクリンリプレッサータンパク質を構成的に生産するT-REX-CHO細胞(Invitrogen)を、プラスミドpEYSM1でトランスフェクトした。トランスフェクタントは、25  $\mu$ g/mlのゼオシン(Invitrogen)を含む培地で選択し、1  $\mu$ g/mlの存在下で、選択した細胞の、TyrRS (V37C195)の発現を調べて、CHO-Y細胞を得た。アロタンパク質の合成のために、CHO-Y細胞は、ras(Am)と*Bacillus stearothermophilus*サプレッサーtRNA<sup>Tyr</sup>遺伝子を含むプラスミドでトランスフェクトした。トランスフェクションの24時間後に、テトラサイクリン(1  $\mu$ g/ml)と3-ヨード-L-チロシン(0.3 mM)を培地に添加し、さらに24時間後に細胞抽出物を調製した。

(5) アンバーコドンに対する、3-ヨード-L-チロシン取りこみ

3-ヨード-L-チロシンのタンパク質中への取りこみのために、以下の2つの点を考慮した。第1に、哺乳類細胞は、周囲の環境から、本来のアミノ酸と、それらの種々のアナログを取りこむ、輸送機構を有している。第2に、真核生物と原核生物からの野生型のTyrRSはいずれも、基質として3-ヨード-L-チロシンを認識しない。したがって、3-ヨード-L-チロシンは、おそらく、チロシンの位置に誤った取り込みによる毒性を有していないが、3-ヨード-L-チロシンを認識できる変異のTyrRSは、そのサブレッサー-tRNAへの付着に必要である。

我々は、3-ヨード-L-チロシンを効率的に認識し（アミノ酸活性化のための $K_{cat}/K_m$ 値は、 $3.3 \times 10^3 / M/s$ ）、チロシンを十倍低い効率で認識する（ $K_{cat}/K_m$ 値は、 $3.2 \times 10^2 / M/s$ ）ことが報告されている、大腸菌TyrRS（V37C195）を用いた。さらに、TyrRS（V37C195）は、野生型酵素についての $K_{cat}/K_m$ 値（ $2.3 \times 10^6 / M/s$ ）と比べて、L-チロシンを10000倍低い効率で活性化する。

図5A及び図5Bは、アンバーサプレッションの検出のためのウェスタンブロットの写真である。図5Aは、3-ヨード-L-チロシン非存在下、図5Bは3-ヨード-L-チロシン存在下である。すべてのレーンで、ras(Am)遺伝子が導入された。野生型の大腸菌TyrRS（AとBのレーン1）またはTyrRS（V37C195）（AとBのレーン2）は、*Bacillus stearothermophilus*サブレッサー-tRNA<sup>Tyr</sup>とともに、CHO細胞内で発現した。3-ヨード-L-チロシン（IY）の存在または非存在、及び発現したTyrRSのタイプはwt（TyrRS野生型）、mut（TyrRS（V37C195））で表示した。

図5A及び図5Bに示すように、野生型のTyrRSとTyrRS（V37C195）は、各々、*Bacillus stearothermophilus*サブレッサー-tRNA<sup>Tyr</sup>と、ras(Am)遺伝子とともにCHO細胞で発現した。これらの酵素は、同様のレベルで発現した。3-ヨード-L-チロシン（図5A）の非存在下で、両方の酵素についてアンバーサプレッションが観察されたが、TyrRS（V37C195）のr

as(Am)産物の収率は、野生型酵素の40%に過ぎなかった。このことは、競合する3-ヨード-L-チロシンの非存在下でも、TyrRS (V37C195)は、やはりL-チロシンを認識し、アンバー位置にそれを取りこむことを示す。ついで、3-ヨード-L-チロシンを最終濃度0.3mMになるように培地に添加した(L-チロシンはそれの2倍の濃度で含んでいた(図5B))。3-ヨード-L-チロシンのこの濃度は、細胞増殖に、ほとんど影響を与えなかった。

3-ヨード-L-チロシンの存在下で、TyrRS (V37C195)のサプレッション効率は、野生型酵素に匹敵するレベルまで改善され、3-ヨード-L-チロシンが細胞により効率的に取りこまれ、TyrRS (V37C195)による認識を介してタンパク質中に組み込まれたことを示唆した。

#### (6) Ras産物の確認

3-ヨード-L-チロシン取りこみを確認し、それがアンバー位置(32位)を占めることを確認するために、AchromobacterプロテアーゼI(Lys-C)によって分解し、その分解産物であるペプチド混合物を液体クロマトグラフィー質量分析機(LC-MS)によって解析した。ついで、32位に取りこまれたアミノ酸をマスクロマトグラフィーで、特異的平均質量と、液体クロマトグラフィーにおける溶出時間について解析した(各々、Ser17からLys42までの領域に相当し、ヨードチロシンとチロシンを32位に含む2つの断片(各々、IYとY断片と称する))。

図6A、図6B、及び図6Cは、ras及びras(Am)産物のLC-MS分析の結果を示すグラフである。

図6Aは、ras(Am)断片(チャートa)及びras産物(チャートB)について、UVスペクトルで検出した液体クロマトグラフィーの結果である。

図6Bは、ras(Am)産物(チャートa及びb)及びras産物(チャートc及びd)からの、IY断片について(チャートa及びc)及びY断片(チャートb及びd)の質量スペクトルの結果である。Y断片はRasタンパク質の残基17-42(SALTIQLIQNHVDEYDPTIEDSYRK)からなり、IY断片は下線のYが3-ヨード-L-チロシンに置換されたものである。

図6 Cは、I Y断片のタンデム質量スペクトルの結果である。N末端からC末端方向の部分配列は、Val、Asp、Glu、ヨードチロシン及びAspである。

ras(Am)産物の分析において、I Y断片は強く観察され(図6 B、チャートA)、3-ヨード-L-チロシンの効率的取りこみを示した。タンデム質量スペクトルによって決定されたこのI Y断片の部分配列は、ヨードチロシンが32位に実際に取りこまれたことを確認した(図6 C)。他方、Y断片は検出されず(図6 B、チャートb)、3-ヨード-L-チロシンが、32位でのL-チロシンの取りこみを阻害したことを示した。LC-MSデータのさらなる分析は、他の正規のアミノ酸がこの位置に取りこまれなかったことを示した。ヨードチロシンが32位を示すことは、こうして、LC-MS分析により評価された。これに対して、3-ヨード-L-チロシンの存在下で合成されたras(WT)産物については、Y断片は観察された(チャートd)が、I Y断片は観察されなかった(図6、チャートc)。このことは、いずれの誤認識も、チロシンの位置に3-ヨード-L-チロシンを取りこむであろうから、CHO細胞中の内因性のTyrRSは、3-ヨード-L-チロシンを認識せず、TyrRS(V37C195)は内因性のtRNA<sup>Tyr</sup>を認識しないことを示している。

図6 Bに示すように、3-ヨード-L-チロシンを含有するペプチドのピークが検出された(図6 B(a))。他方、もしUAGコドンが3-ヨード-L-チロシン以外のアミノ酸に翻訳されているとするとチロシンに翻訳される可能性が最も高いが、チロシンを含むペプチドは検出されなかった(図6 B(b))。同様に、UAGコドンが他のアミノ酸に翻訳されると生じるはずのペプチドは一切検出されなかった。

この解析結果は、生産されたRasタンパク質のほぼ100%が、UAGコドンによって指定された位置に3-ヨード-L-チロシンを含有していることを示しており、本発明が期待通りの効果を与えることが示された。

(7) 変異体TyrRSの誘導可能な発現により制御される3-ヨード-L-チロシンの条件取りこみ

大腸菌GlnRSは、テトラサイクリン制御プロモーターから哺乳類で発現し、

誘導サプレッションをおこす。我々は、他のタイプのテトラサイクリン制御プロモーターから発現する、TyrRS (V37C195) 遺伝子を安定に保持するCHOセルライン (CHO-Y細胞と称する) を創出した。ras(Am)遺伝子と*Bacillus stearothermophilus* サプレッサー tRNA<sup>Tyr</sup> 遺伝子について、CHO-Y細胞中に一時的に導入した。

図7は、Rasタンパク質の3-ヨード-L-チロシンの取りこみについて、誘導可能なアンバーサプレッションのウェスタンブロットの写真である。ras(Am)遺伝子は、CHO-Y細胞に導入された。ras(Am)遺伝子は、*Bacillus stearothermophilus* サプレッサー tRNA<sup>Tyr</sup> とともに (レーン1-3) CHO-Y細胞に導入された。レーン1は、テトラサイクリンと3-ヨード-L-チロシン添加、レーン2はテトラサイクリンを添加し、3-ヨード-L-チロシン無添加、レーン3はテトラサイクリンも3-ヨード-L-チロシンも添加していないことを、それぞれ示す。

図7に示すように、TyrRS (V37C195) は、テトラサイクリンが培地に存在するときに発現した (図7、レーン1及び2) が、インデューサーなしでは発現しなかった (レーン3)。発現レベルは、一時的に細胞中に導入したプラスミドから発現したTyrRS (V37C195) のレベルの2倍であった。3-ヨード-L-チロシンとテトラサイクリンの両方の存在下で、サプレッション効率30%でras(Am)産物を検出した (レーン1)。ras(Am)産物の品質は、CHO-Y細胞中に同様に生産されるras(WT)の品質とともに、LC-MSにより分析し、プラスミドからのTyrRS (V37C195) 下の品質と同一であることが示された。95%を上回るras(Am)産物が、アンバー位置に3-ヨード-L-チロシンを含み、3-ヨード-L-チロシンは、ras(WT)産物中で検出されなかった。

他方、3-ヨード-L-チロシン非存在下で (レーン2)、ras(Am)産物は、ほとんど検出されず、インデューサー非存在下では (レーン3) 検出されなかった。これらの観察は、テトラサイクリンが、TyrRS (V37C195) 発現の誘導を介して、ras(Am)産物内への3-ヨード-L-チロシン取りこみを有効に条件づけることを示した。図7と図5Aとの比較は、3-ヨード-L-チロシンの非存在下でL-チロシン取りこみが、プラスミドからTyrRS (V37C195)

が発現した場合に比べて、著しく低いことを示す。この予想外の結果は、3回以上の独立した実験で観察された。この現象がいかなる機構に基づくものかについては、さらなる研究の課題である。

## 実施例 2 :

### (1) サプレッサー tRNA の誘導発現系

真核生物の tRNA は、遺伝子内部に転写プロモーター配列 (ボックス A、B) を持つ転写複合体が tRNA 遺伝子上に形成されるが、このとき tRNA 遺伝子の直前の配列に結合するタンパク質因子があるとき、この因子は転写複合体の形成を妨げて tRNA の発現を阻害する。これまでに、酵母、及び粘菌において、テトラサイクリン結合性抑制因子の結合配列の 1 つである tetO<sub>1</sub> を、tRNA 遺伝子の直前に組み込んで、tRNA の発現抑制に成功していた (T. ディンガーマン他、エンボ・ジャーナル、11 巻、1487-1492 頁、1992 年; T. ディンガーマン他、モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー、12 巻、4038-4045 頁、1992 年)。このとき培養液に添加するテトラサイクリンの濃度は 15~30 µg/mL であった。

本実施例では、細胞毒性の低減化を意図してより低いテトラサイクリンの濃度で発現誘導を行なうことを試みた。そのために tetO<sub>1</sub> でなく、抑制因子をより強く結合する配列 tetO<sub>2</sub> をサプレッサー tRNA 遺伝子の直前、10 塩基上流、または 20 塩基上流に組み込んで誘導発現系を 3 通り作製した (TetBst0 (配列 1 ; 配列番号 30)、TetBst1 (配列 2 ; 配列番号 31)、TetBst2 (配列 3 ; 配列番号 32))。

#### TetBst0 (配列 1 ; 配列番号 30)

TCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGGAGGGGTAGCGAAGTGGCTAAACGCGGCGGACTCTAAATCCGCTCCCT  
TTGGGTTTCGGCGGTTTCAATCCGTCCCCCTCCAGACAAGTGCGGTTTTTTCTCCAGCTCCCG

初めの下線部は tetO<sub>2</sub> 配列、次の下線部はサプレッサー tRNA 遺伝子である。

#### TetBst1 (配列 2 ; 配列番号 31)

TCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGTACACGTCGGAGGGGTAGCGAAGTGGCTAAACGCGGCGGACTCTAAA  
TCCGCTCCCTTTGGGTTTCGGCGGTTTGAATCCGTCCCCCTCCAGACAAGTGC GGTTTTTTTCTCCAGCTCCC  
G

初めの下線部はtetO<sub>2</sub>配列、次の下線部はサプレッサー tRNA遺伝子である。

TetBst2 (配列 3 ; 配列番号 3 2)

TCTCCCTATCAGTGATAGAGATCCGCCGACACACGTACACGTCGGAGGGGTAGCGAAGTGGCTAAACGCGGC  
GGACTCTAAATCCGCTCCCTTTGGGTTTCGGCGGTTTGAATCCGTCCCCCTCCAGACAAGTGC GGTTTTTTTTC  
TCCAGCTCCCG

初めの下線部はtetO<sub>2</sub>配列、次の下線部はサプレッサー tRNA遺伝子である。

これらのサプレッション効率を比較し、TetBst0、TetBst1については、それぞれ3コピーの配列を並べたものも作製して比較した。

上記TetBst0、TetBst1、TetBst2を、それぞれプラスミドpBR322のEcoRI-HindIII部位にクローニングした。配列の1、2をそれぞれ3つ並べた配列も同様である(図9)。プラスミドの培養細胞への導入方法と、サプレッション産物の検出は、実施例1(5)と同様に行なった。

1 μg/mLのテトラサイクリン添加でサプレッサー tRNAの発現が誘導され、テトラサイクリン濃度を減らすことができた。これは細胞毒性を低減化するために有用である。

TetBst2は、TetBst1よりもサプレッション効率は低かったので(データ示さず)、TetBst0及びTetBst1について、3コピー並べたもの(3×TetBst0、3×TetBst1)も含めて、サプレッション効率を詳細に解析した。同時に、実施例1(1)で作製したアンバーサプレッサー tRNA遺伝子(BYR(CUA))を9個並べた遺伝子との比較も行なった。結果を図10A及び図10Bに示す。

図10Aには、Rasタンパク質、図10BにはEGF受容体(EGFR)のそれぞれのアンバー変異体の生産量を、ウェスタンブロットのバンド強度から測定し、それをサプレッション効率としてグラフ化した。それぞれ3回の実験データに基

づいて、グラフを作成した。レーン 1 はアンバーコドンをもたない野生型 Ras タンパク質、野生型 EGF R の生産量を示しており、この値を 100 として他のサプレッション効率を数値化した。しかし、野生型タンパク質のバンド強度は、測定限界値を超えていて、実際には 100 を超える値であると推測されるので、ここでは 9 × BYR(CUA) のサプレッション効率と、TetBst の効率の比較だけを議論する。他の実験から、9 × BYR(CUA) による Ras 変異体、EGF R 変異体のサプレッション効率は、それぞれ 24%、及び 20% とわかっている（サカモトラ、ヌクレック・アシッド・リサーチ、30 巻、4692-4699、2002 年）。

1 μg/ml のテトラサイクリンの添加で、サプレッションが誘導されることがわかる。一方、添加しないときにも、サプレッションはある程度観察される。TetBst0 よりも TetBst1 の方が、遺伝子コピー数が 1 つよりも 3 つの方が、サプレッション効率がより高い傾向が見られ、テトラサイクリン非添加時のサプレッションも同じ傾向を示す。3 × TetBst1 の効率の方が、9 × BYR(CUA) よりも有意に高く、非天然型アミノ酸含有タンパク質の生産に有利である。テトラサイクリン非添加時にサプレッションがほとんど起きないのは、TetBst0 × 1 を用いた場合であり、TetBst0 × 1 を用いることが細胞毒性の回避には最も有利であると考えられる。

一般に、動物細胞に対して、アンバー・サプレッションは細胞毒性を示す。このために恒常的に発現するサプレッサー tRNA を用いてサプレッションを行なうと、死細胞の数が増大する可能性がある。

実施例 1 では、サプレッサー tRNA を恒常的に発現させる一方で、これに非天然型アミノ酸を結合させる TyrRS については、テトラサイクリンを培養液に加えることで発現誘導を行なった。すなわち、tRNA はアミノ酸を結合しないとサプレッションを引き起こさないで、非天然型アミノ酸を含有するタンパク質の生産に必要な時間だけ TyrRS を発現させることで、細胞毒性を軽減することを意図したものである。しかし、*Bacillus stearothermophilus* サプレッサー tRNA (Tyr) が細胞内の TyrRS などの aaRS から全く認識されないという保証はないので、本実施例のごとく、サプレッサー tRNA も併せて

発現誘導を行なうことがより好ましい。

[参考例]

TyrRS遺伝子とレポーター遺伝子の構築

変異TyrRS (V37C195) 遺伝子、ras遺伝子及び上皮成長因子受容体レポーター遺伝子のC末端に、適当なPCRプライマーでこれらの遺伝子を増幅することにより、FLAGタグ (DYKDDDDK) を付加した。PCR産物は、各々、哺乳類細胞での発現のために、ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)(Invitrogen)にクローン化した。TyrRS (V37C195) について、PCR産物も、ベクターpcDNA4/TO (Invitrogen) にクローン化して、テトラサイクリン制御発現のためのプラスミドpRYSM1を作製した。ras遺伝子の部位特異的変異を、変異誘発性プライマーを用いたPCRで行なった。同様に、上皮成長因子受容体の1068位のチロシンコドン、アンバーコドンに変異した。緑色蛍光タンパク質 (シアノ蛍光変異) (Clontech) の第1のメチオニン残基を、

ATGGGAAGTAGTCCATAGTGGTGGGAATTCTGCAGATATCCAGCACAGTGGCGGCCGCCGCGTC

(アンバーコドンは下線) (配列番号19)

にコードされている短いペプチドに置換し、さらにFLAGタグを、C末端に付加した。得られた遺伝子を、ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)(Invitrogen)にクローン化した。構築された遺伝子の配列を、ABI Prism 377 DNAシーケンサー (Applied Biosystems) を用いて確認した。

LipofectAMINE 2000(Gibco BRL)の方法に従って、35mmプレート当たり、各レポーター遺伝子発現ベクター、および各サブレッサーtRNA発現ベクター、大腸菌TyrRS発現ベクターのそれぞれについて、0.5-2μgのDNAを用いてトランスフェクションを行なった。Opti-MEM 1(Gibco BRL)を、培地として用いた。細胞抽出物を、トランスフェクションの24時間後に調製し、SDS-PAGEに供し、その後、抗-FLAGM2抗体 (Sigma) と、ECL+免疫検出システム (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてウェスタンブロッティングを行なった。バンドの強度をイメージアナライザー、LAS-1000plus(富士フイルム)を用いて測定した (図4A及び図4B)。

図4 A及び図4 Bは、CHO細胞中のアンバー変異を検出するための、抗FLAG抗体を用いたウェスタンブロットのゲルの写真である。

図4 Aにおいて、野生型ras遺伝子（レーン1）またはras (Am) 遺伝子（レーン2-8）は、それぞれFLAGタグが付加されて、CHO細胞内に導入されたものである。ヒトサプレッサーtRNA<sup>Tyr</sup>（レーン3）または大腸菌TyrRSと大腸菌サプレッサーtRNA<sup>Tyr</sup>（レーン4）はCHO細胞内で発現した。この酵素は、FLAGタグも有している。*Bacillus stearothermophilus*サプレッサーtRNA<sup>Tyr</sup>は、大腸菌TyrRSとともに（レーン5及び8）、または酵素なしで（レーン7）、CHO細胞内で発現し、大腸菌TyrRS単独でもCHO細胞内で発現した（レーン6）。*Bacillus stearothermophilus*サプレッサーtRNA<sup>Tyr</sup>は、1コピーの遺伝子を有するプラスミド（レーン5及び7）から、9コピーの遺伝子を有するプラスミド（レーン8）から、発現した。レーン1は、2.5  $\mu$ gの細胞抽出物をのせたものであり、レーン2-8はその4倍量の細胞抽出物をのせたものである。

図4 Bにおいて、各々FLAGタグが付加された、1068位にアンバーコドンを含む（レーン1-3）、及び野生型EGFR遺伝子（レーン2）、上皮成長因子受容体（EGFR）遺伝子をCHO細胞に導入した。*Bacillus stearothermophilus*サプレッサーtRNA<sup>Tyr</sup>と大腸菌TyrRSペアは細胞中で発現した（レーン3）。レーン1と2で大腸菌TyrRSのレベルで移った弱いバンドは、抗FLAG抗体に反応した内因性タンパク質由来である。

図4 Aに示すように、*Bacillus stearothermophilus*サプレッサーtRNAと大腸菌TyrRSの共発現が、15%の効率でras(Am)中のアンバー変異のサプレッションをおこすことを見出した（図4 A、レーン5）。このサプレッションは、このtRNA（レーン6）または酵素（レーン7）のいずれかの非存在下では起こらなかった。サプレッションのための大腸菌TyrRSの必要性は、*Bacillus* サプレッサーtRNA<sup>Tyr</sup>が、細胞中の内因性のaaRSによってアミノアシル化されないことを示す。他方で、一時的にトランスフェクトされたプラスミドからの、大腸菌TyrRSの発現は、それ自体、CHO細胞の成長速度に殆ど影響を与えない。

この異種の系での、 $tRNA^{Tyr} \cdot TyrRS$ のペアのサプレッション効率は、ヒトサプレッサー $tRNA^{Tyr}$ の効率または、哺乳類細胞で働く(20-40%)他のサプレッサー $tRNAs$ の効率よりも、著しく低かった。サプレッション効率は、サプレッサー $tRNA$ 遺伝子を増加させる事により改善できるため、9コピーの*Bacillus stearothermophilus*サプレッサー $tRNA^{Tyr}$ 遺伝子を有するプラスミドを構築し、CHO細胞に、大腸菌 $TyrRS$ 遺伝子を有するプラスミドとともに導入した。こうして24%までサプレッション効率を改善した(図4A、レーン8)。この値は、ヒトサプレッサー $tRNA^{Tyr}$ に匹敵するものである。この後、*Bacillus stearothermophilus*サプレッサー $tRNA^{Tyr}$ の発現のためにこのプラスミドを用いた。

*Bacillus stearothermophilus*サプレッサー $tRNA^{Tyr}$ と大腸菌 $TyrRS$ とのペアは、ヒト胚性腎293細胞アンバー変異を、CHO細胞中での効率と同様にサプレッションをおこした。さらに、上皮成長因子受容体遺伝子のアンバー変異は、効率20%でサプレッションを受けた(図4B)が、*Aequorea victoria* 緑蛍光タンパク質遺伝子中のアンバー変異は、同じ効率でサプレッションを受けた。

これらの遺伝子と $ras(Am)$ 遺伝子は、アンバーコドンの周囲に、異なるコドンを持っている。

#### [比較例]

哺乳類細胞中のアンバーサプレッションに対する、原核生物の $tRNA^{Tyr} \cdot TyrRS$ ペアの発現の必要性

真核細胞での $tRNA$ の発現は、 $RNA$ コーディング配列内の2つの内部プロモーター(ボックスAとB)を必要とする。大腸菌 $tRNA^{Tyr}$ 配列は、ボックスBしか含まないため、U9とC10をAとGで各々置換し、ボックスAを作製した(図2)。その結果得られたミスマッチ塩基対、G10-G25は、G25をCに置換して修正した(以下、 $tRNA^{Tyr}$  (A9G10C25)という)。大腸菌 $tRNA^{Tyr}$ の9位、10位、25位は、3次元の相互作用に関与しており、L型構造を支えている。

CUAアンチコドンをもつ  $tRNA^{Tyr}$  (A9G10C25) の配列を、ヒト  $tRNA^{Tyr}$  遺伝子の 5' フランキング配列に結合した。ヒトサプレッサー  $tRNA^{Tyr}$  遺伝子は、アンバーサプレッションのコントロールと同様に構築した。アンバーサプレッションを解析するため、野生型 c-Ha-Ras についてトランケートした、合成 ras 遺伝子中の 32 位のチロシンコドンをもつアンバーコドンに変異した。発現を検出するため、FLAG ペプチドタグを、ras 遺伝子、ras(WT)、そのアンバー変異体 ras(Am) の C 末端と、大腸菌 TyrRS の C 末端に添加した。

これらの ras 遺伝子を、CHO 細胞に導入し、それらの産物を、抗FLAG抗体を用いた、細胞抽出物のウェスタンブロットにより検出した (図4A)。サプレッサー  $tRNA$  の非存在下で、ras(WT) 遺伝子の発現が検出されたが (レーン1)、ras(Am) の発現は検出されなかった (レーン2)。これは、細胞内部の固有のサプレッサー活性の欠如を示している。ヒトサプレッサー  $tRNA^{Tyr}$  は、バンドの強度 (レーン3) で検出されるように、ras(Am) 中のアンバー変異を、26% の効率で、サプレッションをおこした。他方で、CUAアンチコドンをもつ大腸菌  $tRNA^{Tyr}$  (A9G10C25) は、大腸菌からの野生型の TyrRS とともに、サプレッションを起さなかった (レーン4)。ついで、我々は、ボックスA (G9G10C25) を生成することができる他のヌクレオチドのセットを用いて、他の大腸菌サプレッサー  $tRNA^{Tyr}$  変異体を調べた。この  $tRNA$  もサプレッションをおこすことができなかった。このように、大腸菌サプレッサー  $tRNA^{Tyr}$  変異体のボックスAの生成は、サプレッション活性を損ねた。これは、おそらく3次構造が維持できずに、 $tRNA$  の成熟またはアミノアシル化の阻害をおこしたためであると考えられた。

#### 産業上の利用可能性

本発明の発現方法によれば、大腸菌由来の上記変異 TyrRS と、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来の上記サプレッサー  $tRNA$  とを発現させた動物細胞において、さらにナンセンス・コドンをもつ人為的に導入した遺伝子が発現させることで、培地中から細胞内に取り込まれた非天然型アミノ酸をナンセンス・コドンの部位に含有したタンパク質を生産することが

できる。

従来は、生物が培地から取り込んだ非天然型アミノ酸を任意の指定された部位に含有したタンパク質を生産する有効なシステムとしては、大腸菌を用いたシステムしか存在しなかったが、本発明によれば、非天然型アミノ酸を特定の部位に含有したタンパク質を動物細胞で調製することが容易である。ヒトを含めた動物のタンパク質を発現させるには、大腸菌よりも動物細胞が適しており、大腸菌では調製が難しいタンパク質で、非天然型アミノ酸を含有したタンパク質を生産することが可能である。

非天然型アミノ酸をタンパク質に導入する効用は様々であるが、3-ヨードチロシンや4-ヨード-L-フェニルアラニンを導入すると、タンパク質のエックス線結晶解析のための重原子置換の導入や、放射活性のあるヨード原子でタンパク質をラベルすることが可能である。特に、ヨウ素原子は、NMRによる構造解析において、特徴的なシグナルを発するので、ヨウ素原子を所望の場所に取りこませたタンパク質は、タンパク質の機能及び構造解析の効率化を可能とする。

O-メチル-L-チロシンについても、メチル基に同位体炭素原子を導入しておけば、タンパク質の指定の位置を同位体原子によって標識することができ、NMRによるタンパク質の解析に役立つと考えられる。

また、アセチル基は反応性の高い官能基であることから、4-アセチル-L-フェニルアラニンなどの、アセチル基を含有する非天然型アミノ酸を導入すると、所望の分子構造を持つ化合物を、この官能基を介してタンパク質の所望の位置に共有結合することができ、さらに多様な修飾が可能となる。

また、4-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、4-アジド-L-フェニルアラニンなどは、特定の波長の光を照射することで、近くに存在する分子と共有結合を生じるという性質を有していることが知られている（例えば、J.チンら、ケムバイオケム (Chem Bio Chem)、第11巻、2002年、p. 1135-1137参照）。したがって、これらの非天然型アミノ酸をタンパク質の所定の位置に導入すれば、そのタンパク質と相互作用している細胞内の未知の物質の検出が可能となると考えられる。

さらに、これらの非天然型アミノ酸取りこみタンパク質は、それ自体で、新た

な生理活性を有する物質となり得るので、新薬またはドラッグデリバリーシステムの開発にも有用であると考えられる。

さらに、次の2つの理由によって、ヨードチロシン組み込みタンパク質は、細胞情報伝達系の解析に役立つ可能性がある。

第1に、タンパク質中のチロシン残基をリン酸化する酵素（チロシン・リン酸化酵素）は、ヨードチロシン残基をリン酸化できないか、リン酸化できるかのいずれかである。リン酸化できない酵素は、立体構造に基づいた改変を行なうことでリン酸化できるようになる可能性がある。一方、リン酸化できる酵素は、立体構造に基づいた改変を行なうことで、リン酸化できなくなる可能性がある。調べたい部位のチロシン残基をヨードチロシンに置換し、これらの酵素改変体を細胞内で発現させたときに、リン酸化が起きるかとうかを観察することで、当該チロシン残基のリン酸化にこの酵素がかかわっているか否かを判定できる可能性がある。

第2に、タンパク質のチロシン残基から、リン酸基を除去する酵素（脱リン酸化酵素）は、リン酸化酵素と協同してタンパク質の活性制御を行なっているが、リン酸化されたヨードチロシンは脱リン酸化されにくいため、リン酸化によって活性化されたタンパク質の活性を長く持続させる可能性がある。この結果として生起する細胞内現象を観察することで、当該タンパク質のリン酸化が細胞機能において果たす役割を解析することができる。

また、本発明のサプレッサーもRNA発現ベクターは、動物細胞中のナンセンス変異のサプレッションを可能にするので、ナンセンス変異に関連する疾患などの遺伝子治療に用いられる可能性がある。

## 請求の範囲

1. (A) 大腸菌由来のチロシル tRNA 合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシル tRNA 合成酵素と、

(B) 上記変異チロシル tRNA 合成酵素の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス (*Bacillus*) 属、マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 属、又はスタフィロコッカス (*Staphylococcus*) 属真性細菌由来のサプレッサー tRNA と、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子とを動物細胞中で発現させて、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の発現方法。

2. 上記チロシン誘導体が、3 位置換チロシンまたは 4 位置換チロシンである、請求の範囲第 1 項記載の発現方法。

3. 上記 (B) サプレッサー tRNA がバチルス・ステアロサーモフィラス (*Bacillus stearothermophilus*) 由来のサプレッサーチロシル tRNA である請求の範囲第 1 項または第 2 項に記載の発現方法。

4. (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、チロシル tRNA 合成酵素の 37 位チロシン及び 195 位グルタミンに相当する位置に改変を受けた変異 Tyr RS である請求の範囲第 1 項乃至第 3 項のいずれか一項に記載の発現方法。

5. (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、チロシル tRNA 合成酵素の 37 位チロシン (Y) に相当する位置が、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) により置換され、かつチロシル tRNA 合成酵素の 195 位グルタミン (Q) に相当する位置が、アラニン (A)、システイン (C)、セリン (S)、またはアスパラギン (N) で置換された変異 Tyr R

Sである請求の範囲第4項に記載の発現方法。

6. 上記動物細胞が、哺乳類細胞である請求の範囲第1項乃至第5項のいずれか一項に記載の発現方法。

7. 請求の範囲第1項乃至第6項のいずれか一項に記載の方法にしたがって発現させたタンパク質を回収し、精製することを特徴とする、非天然型アミノ酸組み込みタンパク質の製造方法。

8. (A) 大腸菌由来のチロシルtRNA合成酵素の変異体であって、チロシンに対する特異性に比べて非天然型のチロシン誘導体に対する特異性が高められた変異チロシルtRNA合成酵素を動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(B) 上記変異チロシルtRNA合成酵素の存在下で上記チロシン誘導体と結合可能な、バチルス属、マイコプラズマ属、又はスタフィロコッカス属真性細菌由来のサプレッサーtRNAを、上記動物細胞内で発現させる発現ベクターと、

(C) 所望の位置にナンセンス変異を受けた所望のタンパク質遺伝子を上記動物細胞内で発現させる発現ベクター

とを含有し、上記タンパク質のナンセンス変異の位置に上記チロシン誘導体を取りこませることができる動物細胞。

9. 上記チロシン誘導体が、3位置換チロシンまたは4位置換チロシンである、請求の範囲第8項に記載の動物細胞。

10. 上記(B) サプレッサーtRNAがバチルス・ステアロサーモフィラス由来のサプレッサーチロシンtRNAである請求の範囲第8項または第9項に記載の動物細胞。

11. 上記(A) 変異チロシルtRNA合成酵素が、チロシルtRNA合成酵素の37位チロシン及び195位グルタミンに相当する位置に改変を受けた変異

チロシル tRNA 合成酵素である請求の範囲第 8 項乃至第 10 項のいずれか一項に記載の動物細胞。

12. 上記 (A) 変異チロシル tRNA 合成酵素が、チロシル tRNA 合成酵素の 37 位チロシン (Y) に相当する位置が、バリン (V)、ロイシン (L)、イソロイシン (I) またはアラニン (A) により置換され、かつチロシル tRNA 合成酵素の 195 位グルタミン (Q) に相当する位置が、アラニン (A)、システイン (C)、セリン (S)、またはアスパラギン (N) で置換された変異 TyrRS である請求の範囲第 11 項に記載の動物細胞。

13. 哺乳類細胞である請求の範囲第 8 項乃至第 12 項のいずれか一項に記載の動物細胞。

14. 配列番号 1、配列番号 30、配列番号 31、及び配列番号 32 からなる群から選ばれる一の配列を有する DNA。

15. 動物細胞内で認識される制御配列から発現可能に、配列番号 1、配列番号 30、配列番号 31、及び配列番号 32 からなる群から選ばれる一の配列を含有してなる発現ベクター。

16. 配列番号 1 の配列を有する DNA が同方向に 9 個配列されてクローン化された、請求の範囲第 15 項に記載の発現ベクター。

図 1

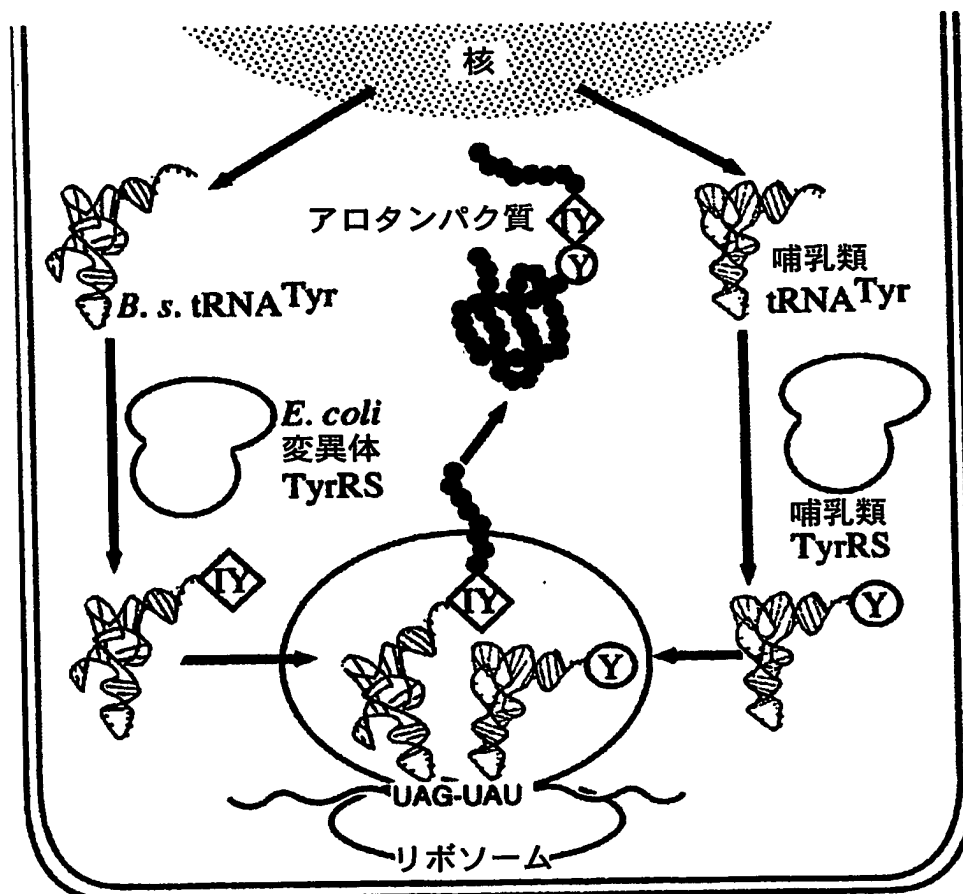
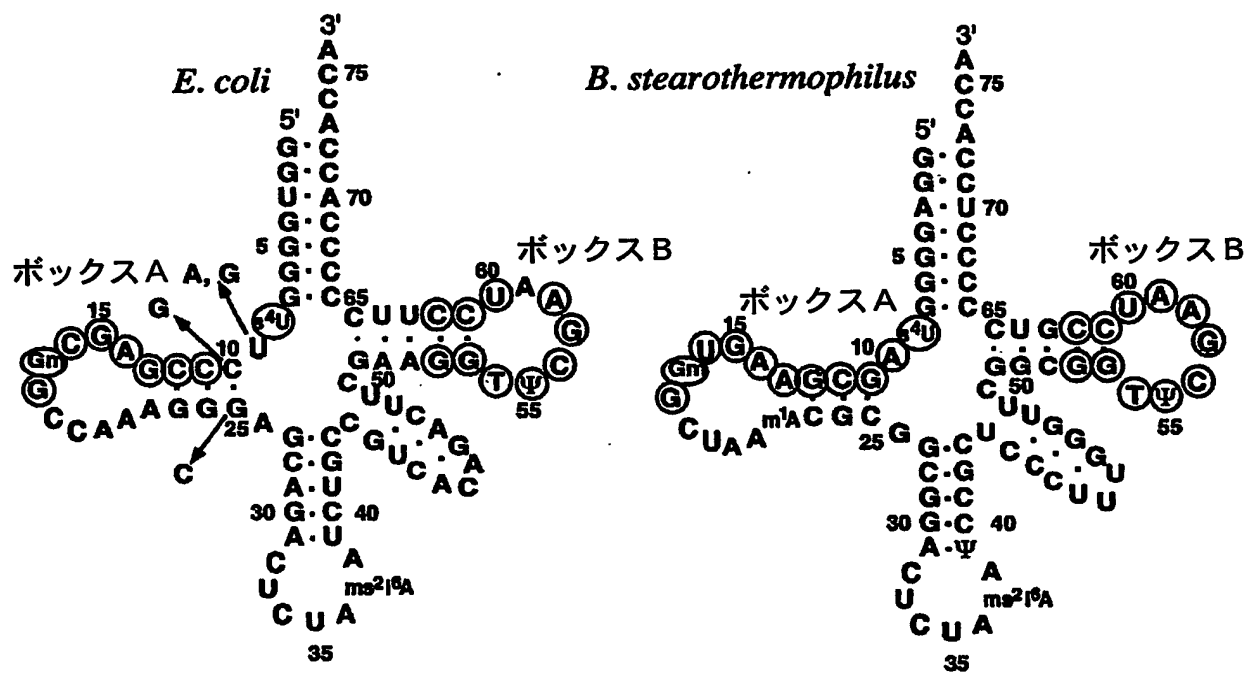


図 2



3/8

図 3

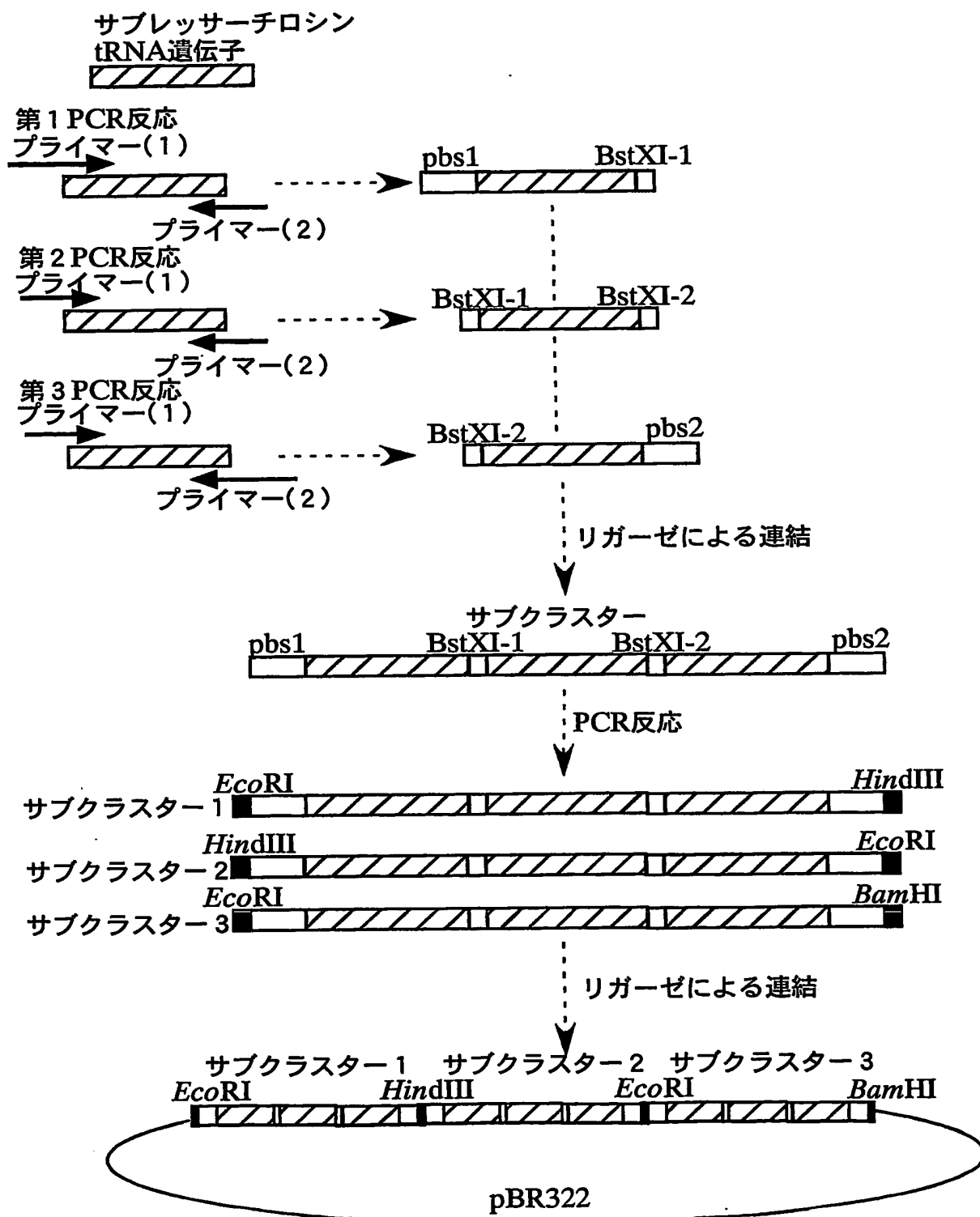


図 4 A

図 4 B

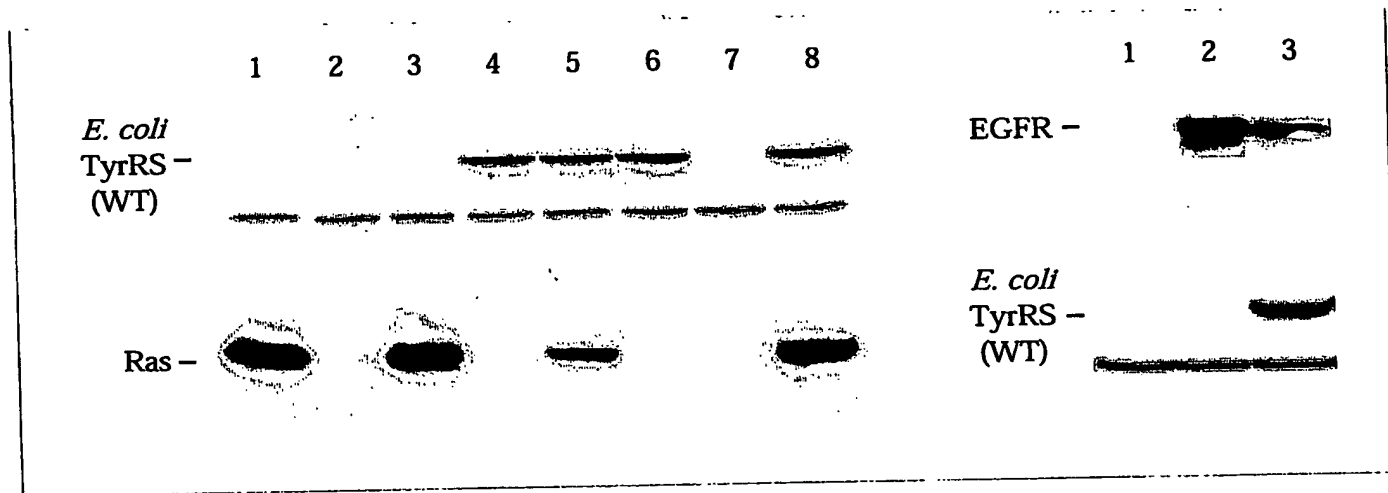
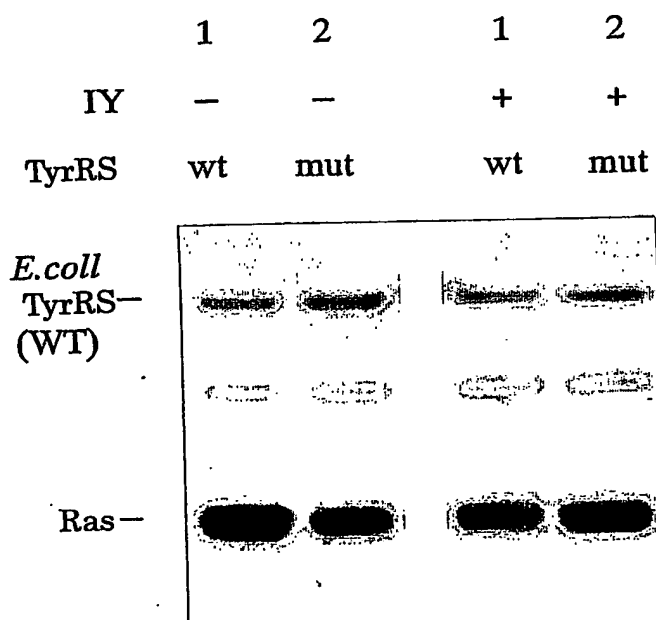


図 5 A

図 5 B



5/8

図 6 A

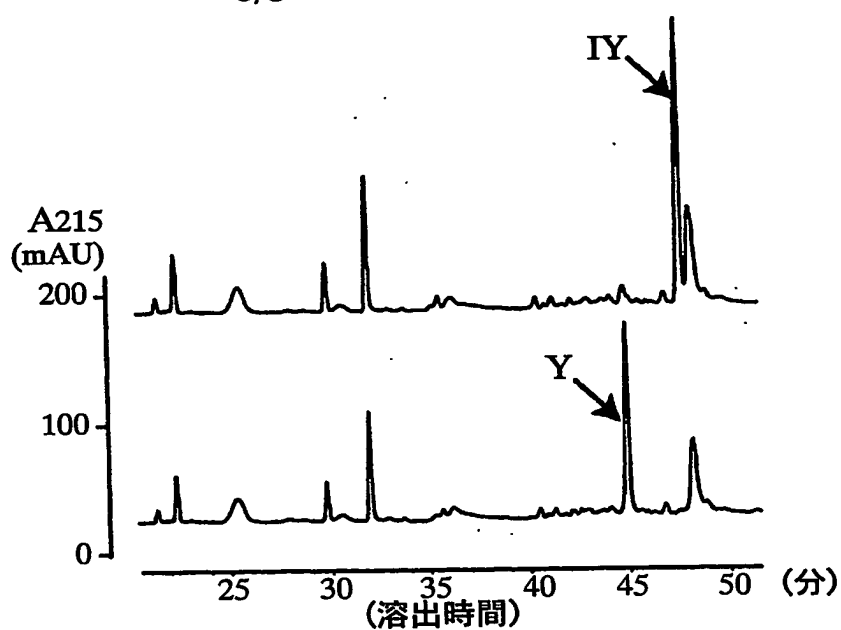


図 6 B

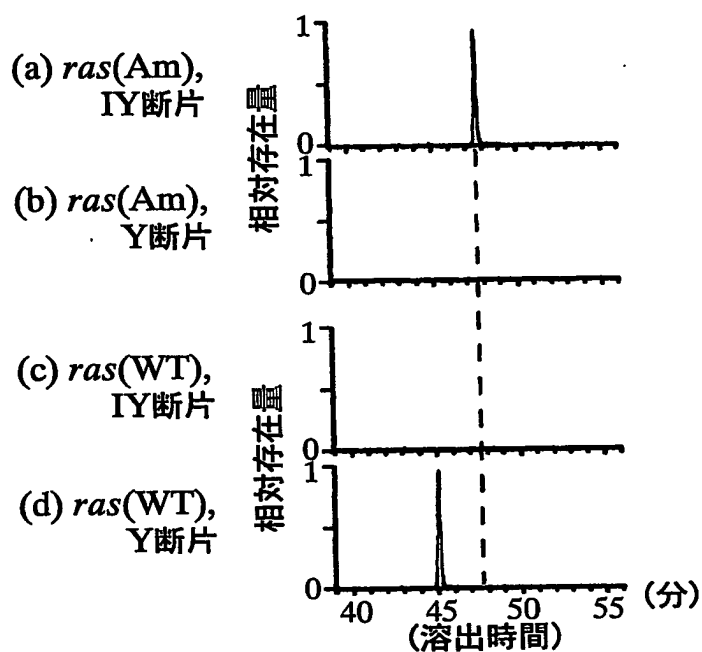
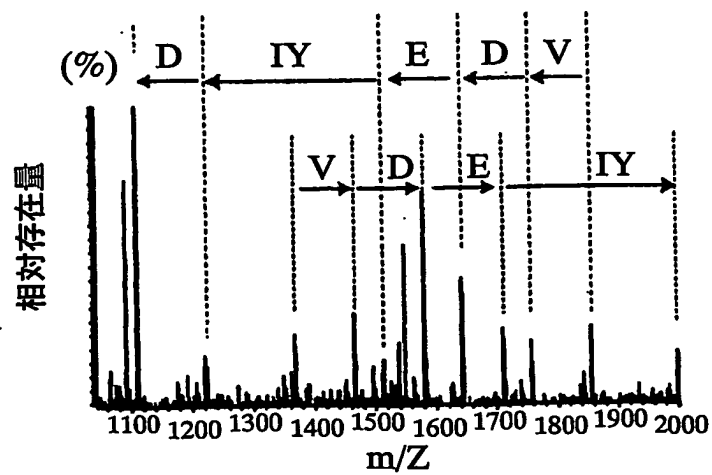


図 6 C



6/8

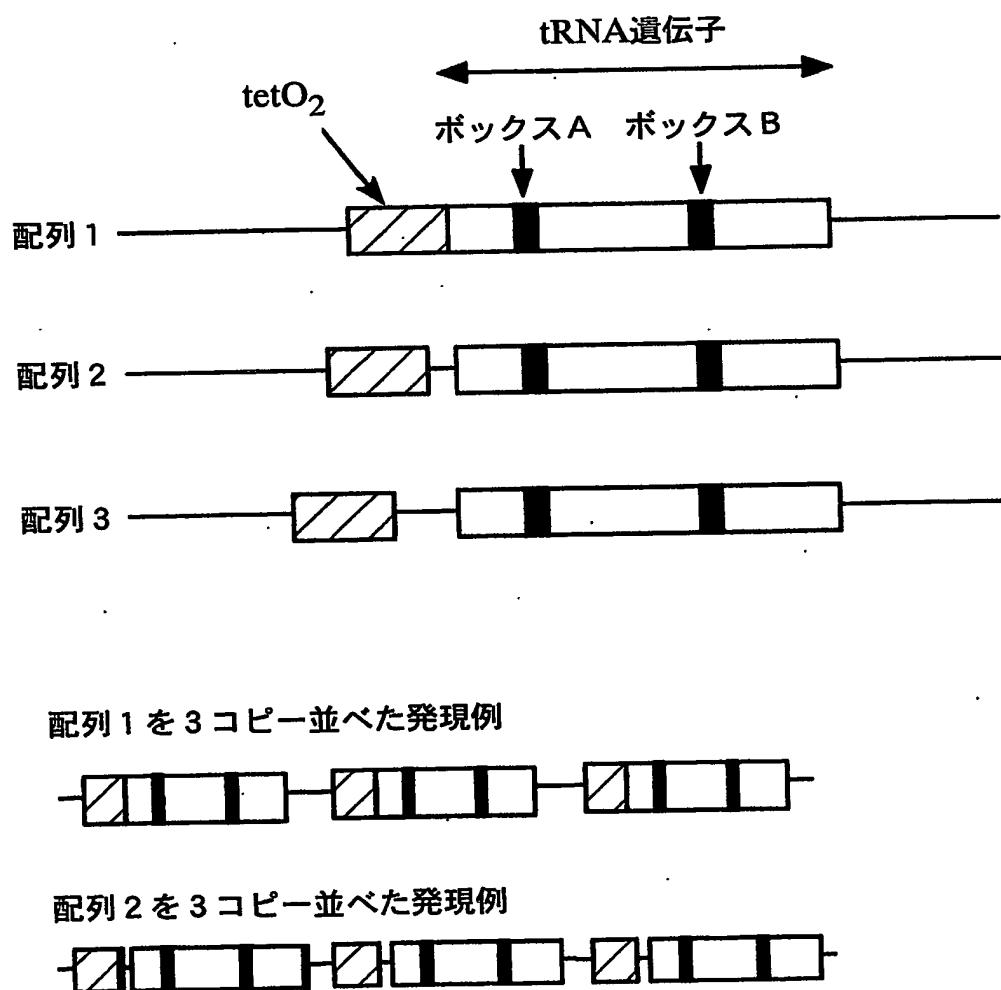
図 7



図 8

MASSNLIKQL	QERGLVAQVT	DEEALAERLA	30
QGPIALY <u>Y</u> CGF	DPTADSLHLG	HLVPLLCLKR	60
FQQAGHKPVA	LVGGATGLIG	DPSFKAAERK	90
LNTEETVQEW	VDKIRKQVAP	FLDFDCGENS	120
AIAANNYDWF	GNMNVLTFLR	DIGKHFSVNQ	150
MINKEAVKQR	LNREDQGISF	TEFSYNLLQG	180
YDFACLNKQY	GVVL <u>Q</u> IGGSD	QWGNITSGID	210
LTRRLHQNQV	FGLTVPLITK	ADGTKFGKTE	240
GGAVWLDPKK	TSPYKFYQFW	INTADADVYR	270
FLKFFTFMSI	EEINALEEED	KNSGKAPRAQ	300
YVLAEQVTRL	VHGEEGLQAA	KRITECLFSG	330
SLSALSEADF	EQLAQDGVPM	VEMEKGADLM	360
QALVDSELQP	SRGQARKTIA	SNAITINGEK	390
QSDPEYFFKE	EDRLFGRFTL	LRRGKKNYCL	420
ICWK			424

図 9



8/8

図 1 0 A

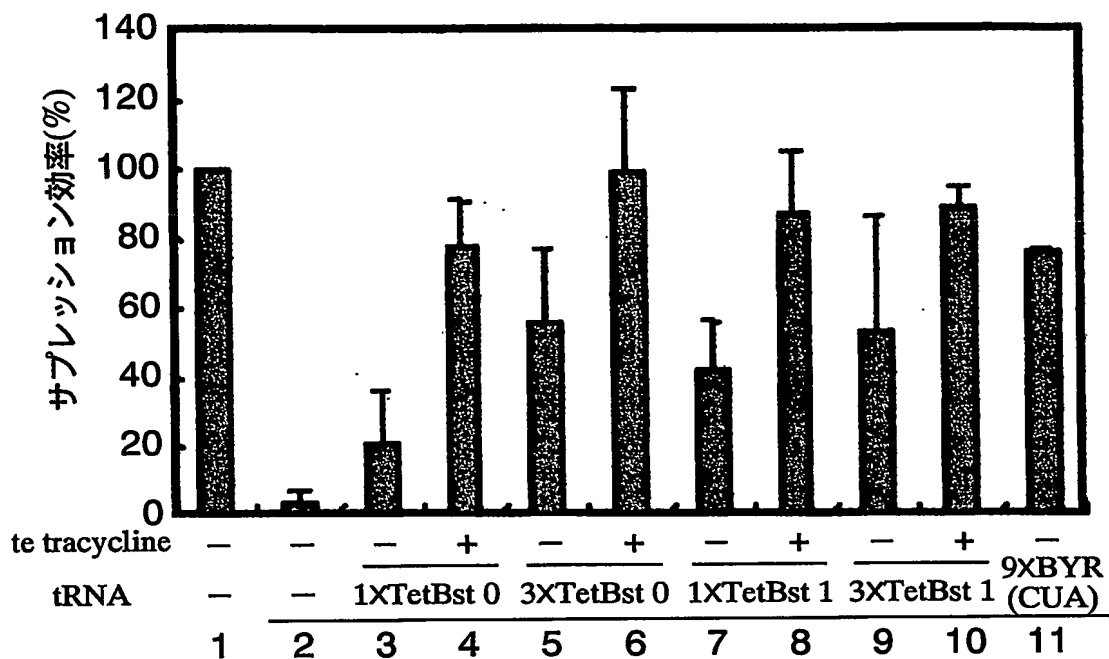
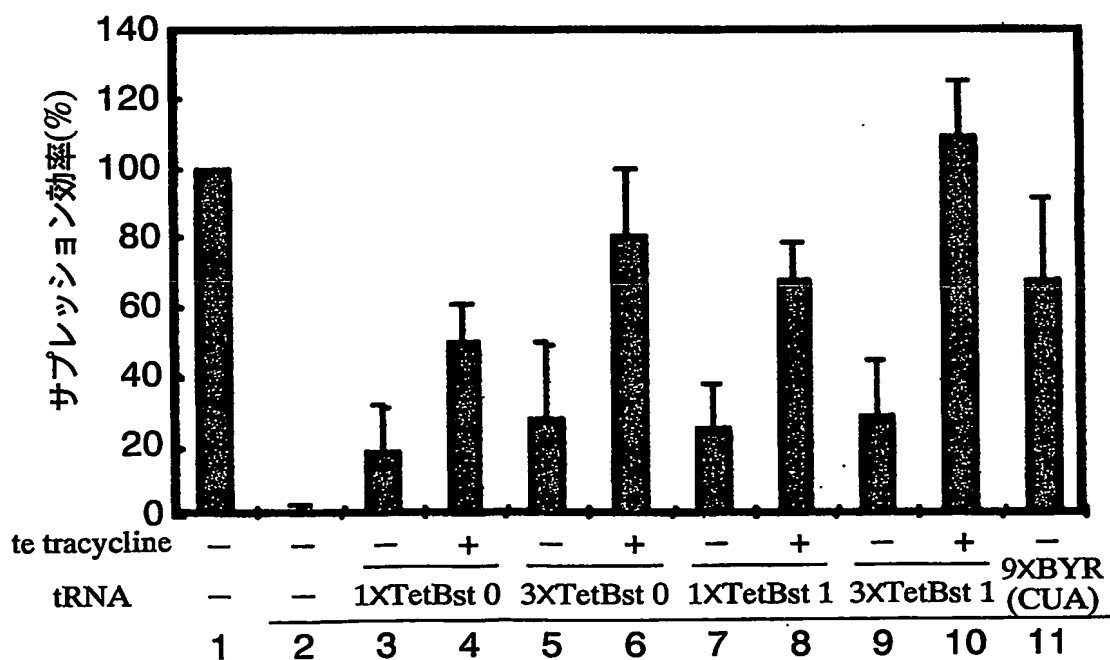


図 1 0 B



## SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN; Japan Science and Technology Agency

<120> A method of expressing a protein in which an unnatural amino acid is incorporated

<150> JP2002-318846

<151> 2002-10-31

<160> 29

<210> 1

<211> 167

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

agcgcgccg tttttctgtg ctgaacctca ggggacgccg acacacgtac acgtcggagg  
ggtagcgaag tggctaaacg cggcggactc taaatccgct ccctttgggt tcggcggttc  
gaatccgtcc ccctccagac aagtgcggtt tttttctcca gctcccg 167

<210> 2

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

ggaattccat atggcaagca gtaacttgat taaacaattg caag 44

2/13

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 50

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 3

gccgaagctt gtcgactttc cagcaaatca gacagtaatt ctttttaccg 50

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 4

aggatcgaag ccgcaagcga gcgcgatcgg gccttgccg 40

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 5

aggatcgaag ccgcamnnga gcgcgatcgg gccttgccg 40

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

3/13

&lt;400&gt; 6

acggtgtggt gctgtctatt ggtggttctg acc 33

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 7

acggtgtggt gctggcaatt ggtggttctg acc 33

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 8

acggtgtggt gctgaacatt ggtggttctg acc 33

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 9

acggtgtggt gctgtgcatt ggtggttctg acc 33

&lt;210&gt; 10

4/13

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 10

ttcttcggat ccaaccagac tgcgcgcct tc 32

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 11

gatcatctgg ttaacggaga agtgtttgcc 30

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 12

gaccttcctg tgcgatattg gcaaac 26

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 13

5/13

trgcnnagyn gg 12

<210> 14

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

ggttcgantic c 11

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

agcgagtgtt aaccctgcct 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

cgactacgat attcgcgag 20

<210> 17

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

ccagcagact gg 12

<210> 18

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

ccagcttcct gg 12

<210> 19

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 19

atgggaacta gtccatagtg gtggaattct gcagatatcc agcacagtgg cggccgccgc  
gtc 63

<210> 20

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 20

agttcgantc t 11

7/13

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 21

cacagaattc tcgggagctg gagaaaaaaaa c 31

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 22

cacaaagctt agcgctccgg tttttctgtg 30

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 23

agcgagtgtt aaccctgcct agcgctccgg tttttctgtg 40

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 38

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<400> 24

acacacccag cagactggcg ggagctggag aaaaaaac 38

<210> 25

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 25

acacacccag cagactggag cgctccggtt tttctgtg 38

<210> 26

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 26

acacacccag cttcctggcg ggagctggag aaaaaaac 38

<210> 27

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 27

acacacccag cttcctggag cgctccggtt tttctgtg 38

<210> 28

9/13

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 28

ctgcgcgaat atcgtagtcg cgggagctgg agaaaaaac 40

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 424

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Escherichia coli

&lt;400&gt; 29

Met	Ala	Ser	Ser	Asn	Leu	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Glu	Arg	Gly	Leu
1				5					10					15

Val	Ala	Gln	Val	Thr	Asp	Glu	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	Ala
				20					25					30

Gln	Gly	Pro	Ile	Ala	Leu	Tyr	Cys	Gly	Phe	Asp	Pro	Thr	Ala	Asp
				35					40					45

Ser	Leu	His	Leu	Gly	His	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Cys	Leu	Lys	Arg
				50					55					60

Phe	Gln	Gln	Ala	Gly	His	Lys	Pro	Val	Ala	Leu	Val	Gly	Gly	Ala
				65					70					75

10/13

Thr Gly Leu Ile Gly Asp Pro Ser Phe Lys Ala Ala Glu Arg Lys  
80 85 90

Leu Asn Thr Glu Glu Thr Val Gln Glu Trp Val Asp Lys Ile Arg  
95 100 105

Lys Gln Val Ala Pro Phe Leu Asp Phe Asp Cys Gly Glu Asn Ser  
110 115 120

Ala Ile Ala Ala Asn Asn Tyr Asp Trp Phe Gly Asn Met Asn Val  
125 130 135

Leu Thr Phe Leu Arg Asp Ile Gly Lys His Phe Ser Val Asn Gln  
140 145 150

Met Ile Asn Lys Glu Ala Val Lys Gln Arg Leu Asn Arg Glu Asp  
155 160 165

Gln Gly Ile Ser Phe Thr Glu Phe Ser Tyr Asn Leu Leu Gln Gly  
170 175 180

Tyr Asp Phe Ala Cys Leu Asn Lys Gln Tyr Gly Val Val Leu Gln  
185 190 195

Ile Gly Gly Ser Asp Gln Trp Gly Asn Ile Thr Ser Gly Ile Asp  
200 205 210

Leu Thr Arg Arg Leu His Gln Asn Gln Val Phe Gly Leu Thr Val  
215 220 225

11/13

Pro Leu Ile Thr Lys Ala Asp Gly Thr Lys Phe Gly Lys Thr Glu

230

235

240

Gly Gly Ala Val Trp Leu Asp Pro Lys Lys Thr Ser Pro Tyr Lys

245

250

255

Phe Tyr Gln Phe Trp Ile Asn Thr Ala Asp Ala Asp Val Tyr Arg

260

265

270

Phe Leu Lys Phe Phe Thr Phe Met Ser Ile Glu Glu Ile Asn Ala

275

280

285

Leu Glu Glu Glu Asp Lys Asn Ser Gly Lys Ala Pro Arg Ala Gln

290

295

300

Tyr Val Leu Ala Glu Gln Val Thr Arg Leu Val His Gly Glu Glu

305

310

315

Gly Leu Gln Ala Ala Lys Arg Ile Thr Glu Cys Leu Phe Ser Gly

320

325

330

Ser Leu Ser Ala Leu Ser Glu Ala Asp Phe Glu Gln Leu Ala Gln

335

340

345

Asp Gly Val Pro Met Val Glu Met Glu Lys Gly Ala Asp Leu Met

350

355

360

Gln Ala Leu Val Asp Ser Glu Leu Gln Pro Ser Arg Gly Gln Ala

12/13

365

370

375

Arg Lys Thr Ile Ala Ser Asn Ala Ile Thr Ile Asn Gly Glu Lys

380

385

390

Gln Ser Asp Pro Glu Tyr Phe Phe Lys Glu Glu Asp Arg Leu Phe

395

400

405

Gly Arg Phe Thr Leu Leu Arg Arg Gly Lys Lys Asn Tyr Cys Leu

410

415

420

Ile Cys Trp Lys

424

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 135

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;400&gt; 30

tctccctatc agtgatagag atcggagggg tagcgaagtg gctaaacgcg gcggactcta  
aatccgctcc ctttgggttc ggcgggttcga atccgtcccc ctccagacaa gtgcggtttt  
tttctccagc tcccg 135

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 145

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<400> 31

tctccctatc agtgatagag atccgtacac gtcggagggg tagcgaagtg gctaaacgcg  
gcggactcta aatccgctcc ctttgggttc ggcggttcga atccgtcccc ctccagacaa  
gtgcggtttt tttctccagc tcccg 145

<210> 32

<211> 155

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 32

tctccctatc agtgatagag atccgccgac acacgtacac gtcggagggg tagcgaagtg  
gctaaacgcg gcggactcta aatccgctcc ctttgggttc ggcggttcga atccgtcccc  
ctccagacaa gtgcggtttt tttctccagc tcccg 155

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14028

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/85, 5/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/85, 5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), WPIDS (STN), JICST FILE (JOIS),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	SAKAMOTO K. et al., Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells, Nucleic Acids Res., 01 November, 2002 (01.11.02), Vol.30, No.21, p.4692-9	1-16
A	Daisuke KIGA et al., "Hen'igata Daichokin Tyrosyl-tRNA Gōsei Koso o Riyo Shita, Shinkaku Seibutsu no Musaibo Honyakukei ni okeru 3-Iodotyrosine no Tanpaku-shitsu eno Bui Tokuiteki Torikumi", Seikagaku, 25 August, 2002 (25.08.02), Vol.74, No.8, page 1011	1-16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
30 January, 2004 (30.01.04)

Date of mailing of the international search report  
10 February, 2004 (10.02.04)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14028

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIGA D. et al., An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system, Proc.Natl.Acad. Sci.USA., 23 July, 2002 (23.07.02), Vol.99, No.15, p.9715-20	1-16
A	WAWROUSEK EF et al., Two large clusters with thirty-seven transfer RNA genes adjacent to ribosomal RNA gene sets in Bacillus subtilis. Sequence and organization of trrD and trrE gene clusters., J.Biol.Chem., 1984, Vol.259, No.6, p.3694-702	14-16

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14028

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

A suppressor tRNA originating in an eubacterium and functioning in animal cells, which is the matter common to claims 1 to 16, has been publicly known (see, if needed, EF Wawrousek et al., Two large clusters with thirty-seven transfer RNA genes adjacent to ribosomal RNA gene sets in *Bacillus subtilis*. Sequence and organization of trnD and trnE gene clusters, J. Biol. Chem., Mar. 1984, vol.259, p.3694-3702). Thus, the above common matter cannot be considered as a special technical feature. Such being the case, the inventions according to claims 1 to 16 are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

(continued to extra sheet)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/14028

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

Therefore, the inventions according to claims 1 to 16 are classified into a group of the inventions according to claims 1 to 13 relating to a method of expressing a protein having an unnatural amino acid integrated thereinto in animal cells and another group of the inventions according to claims 14 to 16 relating to recombinant DNA originating in *Bacillus stearothermophilus* suppressor tRNA.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/85, 5/10

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> C12N15/85, 5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE(STN) BIOSIS(STN) WPIDS(STN) JICSTファイル(JOIS)

SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	SAKAMOTO K et al, Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells, Nucleic Acids Res. , 2002 Nov 1, Vol. 30, No. 21, p. 4692-9	1-16
A	木賀大介 他, 変異型大腸菌チロシル tRNA 合成酵素を利用した, 真核生物の無細胞翻訳系における 3-ヨードチロシンのタンパク質への部位特異的取り込み, 生化学, 2002. 08. 25, Vol. 74, No. 8, p. 1011	1-16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 01. 2004

国際調査報告の発送日

10. 2. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

田中 晴絵

4 N

9 7 3 9

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KIGA D et al, An engineered Escherichia coli tyrosyl-tRNA synthetase for site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in eukaryotic translation and its application in a wheat germ cell-free system, Proc Natl Acad Sci U S A. , 2002 Jul 23, Vol. 99, No. 15, p. 9715-20	1-16
A	WAWROUSEK EF et al, Two large clusters with thirty-seven transfer RNA genes adjacent to ribosomal RNA gene sets in Bacillus subtilis. Sequence and organization of trrD and trrE gene clusters., J Biol Chem. , 1984, Vol. 259, No. 6, p. 3694-702	14-16

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲 1-16 に共通の事項である、動物細胞中で機能する真正細菌由来のサプレッサー tRNA は、公知 (要すれば、EF Wawrousek et al., Two large clusters with thirty-seven transfer RNA genes adjacent to ribosomal RNA gene sets in *Bacillus subtilis*. Sequence and organization of trnD and trnE gene clusters, J. Biol. Chem., Mar 1984, vol. 259, p. 3694-3702 等参照。) であるから、上記共通の事項は特別な技術的特徴とは認められず、よって、請求の範囲 1-16 記載の発明が単一の一般的発明概念を形成するように関連しているとは認められない。

したがって、請求の範囲 1-16 に記載の発明は、請求の範囲 1-13 記載の、動物細胞における非天然型アミノ酸組み込み蛋白質の発現方法に関する発明群と、請求の範囲 14-16 記載の、*Bacillus stearothermophilus* のサプレッサー tRNA 由来の組み換え DNA に関する発明群に区分される。

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**